

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VARIACIÓN ESPACIAL DE LA RESISTENCIA KDR A INSECTICIDAS
PIRETROIDES EN *Aedes Aegypti* (L.) EN MÉXICO.

POR:

KEVIN AARÓN ONTIVEROS ZAPATA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA Y VETERINARIA.

2021

VARIACIÓN ESPACIAL DE LA RESISTENCIA KDR A INSECTICIDAS

PIRETROIDES

EN *Aedes Aegypti* (L.) EN MÉXICO”

Comité de Tesis

Dra. Adriana E. Flores Suarez
Presidente

Dra. Beatriz López Monroy
Secretario

Dr. Gustavo Ponce García
Vocal

Dra. Humberto Quiróz Martínez
Vocal

Dr. Ildefonso Fernández Salas
Vocal

Dra. Katuska Arévalo Nino
Subdirectora de Posgrado



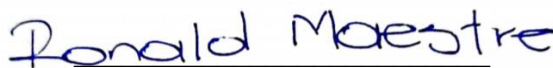
SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

VARIACIÓN ESPACIAL DE LA RESISTENCIA KDR A INSECTICIDAS
PIRETROIDES
EN *Aedes Aegypti* (L.) EN MÉXICO

Dirección de Tesis

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'A. Flores', is positioned above a horizontal line.

Dra. Adriana E. Flores Suarez
Directora

A handwritten signature in blue ink, reading 'Ronald Maestre', is positioned above a horizontal line.

Dr. Ronald Y. Maestre Serrano
Director externo

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL CN1549-21

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez, por ser un faro de luz en medio de la oscuridad, gracias por ser una mujer autentica, justa, disciplinada y apasionada por su labor, a tal grado de inspirar amor por la ciencia, sin su apoyo incondicional difícilmente habría tenido tantas buenas experiencias laborales y de vida, mi gratitud es con usted ayer, hoy y siempre.

A la Dra. Beatriz López Monroy por darme la oportunidad de hacer mi servicio social hace cinco años y siempre tener un trato amable hacia mi persona, sin su guía y apoyo difícilmente estaría concluyendo mi tesis en el Laboratorio de Entomología Medica.

A la Maestra en Ciencias Selene Marlen Gutiérrez Rodríguez por siempre alentarme a echarle ganas, escucharme y guiarme en este proceso, me has facilitado el camino y siempre te estaré agradecido.

A el Dr. Gustavo Ponce García por transmitirme sus conocimientos en el área de campo, por sus consejos, es un ser humano noble, educado y de gran corazón.

A mejor amigo André Gabriel Castro Bautista por acompañarme en esta etapa de mi vida, el mejor colega de carrera y de vida, Te Quiero Mucho.

A mi amigo Alan Esteban Juache Villagrana, por apoyarme con mi salud mental y parte experimental de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología gracias por el financiamiento proporcionado para la realización de mis estudios de Posgrado (2019-2021) Becario No. 27845

DEDICATORIA

A mi madre Graciela Ontiveros Zapata, mujer invencible, dedicada, amorosa e inspiradora, todo lo bueno que hay en mí es por ti mamá, eres mi motor para salir adelante, me has enseñado a nunca darme por vencido, aprovecho para agradecerte por tanto amor y hacer que mis sueños se hagan realidad, siempre estas allí para mí y nunca has juzgado mi proceder. Mi ambición más grande es hacerte feliz eres mi mayor bendición en esta vida, nunca dudes de mi amor por ti. Te Amo.

A mi hermana Sara Graciela Hernández Ontiveros para inspirarla a ser una persona independiente y autosuficiente, siempre te apoyare para que cumplas tus sueños, mis logros son tuyos. Te Amo.

INDICE

Sección	Página
Resumen	13
Abstract	14
1. Introducción	15
2. Antecedentes	17
2.1 El vector <i>Aedes aegypti</i> L.	17
2.2 Resistencia a insecticidas piretroides en <i>Ae. aegypti</i>	17
2.3 Canal de sodio dependiente de voltaje	20
2.4 Resistencia al derribo: mutaciones kdr	20
2.5 Evolución de la resistencia kdr en México	22
2.6 Variabilidad y flujo genético	24
2.7 Análisis espacial de resistencia a insecticidas en mosquitos	25
2.8 Manejo de resistencia a insecticidas	28
3. Justificación	30
4. Hipótesis	31
5. Objetivos	32
5.1 General	32
5.2 específicos	32
6. Material y Métodos	33
6.1 Material Biológico.....	33
6.2 Bioensayos	35
6.3 Extracción de ADN en mosquitos	36
6.4 Amplificación de alelos específicos de las mutaciones kdr por PCR	36
6.5 Análisis de resultados	38
6.5.1 Bioensayos.....	38
6.5.2 Mutaciones kdr	38
6.5.3. Análisis de co-ocurrencia de mutaciones kdr	39
6.5.4 Asociación fenotipo-genotipo	39
6.5.5. Análisis espacial	40
6.5.5.1 Distribución de susceptibilidad a piretroides	40
6.5.5.2 Distribución espacial de las frecuencias kdr	40
6.5.5.3 Análisis espacial de la resistencia a piretroides y mutaciones kdr	41
7. Resultados.....	42
7.1 Bioensayos	42
7.2 Frecuencia de mutaciones V410L, V106I, F1534C en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	44
7.3 Asociación Genotipo-Fenotipo	49
7.4 Distribución de la susceptibilidad a piretroides	58
7.5 Distribución espacial de las frecuencias kdr	59
7.6 Análisis espacial de la resistencia a piretroides y mutaciones kdr	60
8. Discusión	64
9. Conclusiones	70
10. Perspectivas	71
11. Bibliografía	72

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1.- . Listado de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> y ubicación geográfica, sometidas al análisis de predicción espacial	34
2.- Primers utilizados para la detección de la mutación kdr I1016V, C1534F Y V410L	37
3. Mortalidad de hembras de <i>Ae. aegypti</i> después de la exposición a dosis diagnóstico de insecticidas piretroides y estatus en el nivel de resistencia	43
4. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación V410L en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la costa del pacifico y sureste de México	44
5. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación V1016I en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la costa del pacifico y sureste de México	45
6. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación F1534C en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la costa del pacifico y sureste de México	47
7. Asociación de genotipos kdr con la respuesta a bioensayo DD con permetrina	49
8. Asociación de genotipo resistente para V410L con la resistencia a piretroides	50
9. Asociación de genotipo resistente para V1016F con la resistencia a piretroides	51
10. Asociación de genotipo resistente para F1534C con la resistencia a piretroides	52
11. Haplotipos encontrados en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> expuestos a DD permetrina	53
12. Haplotipos encontrados en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> expuestos a DD deltametrina	55
13. Co-ocurrencia de genotipos para las mutaciones V410L, V1016I y F1534C relacionada con la respuesta a bioensayos DD con deltametrina en 10 poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	57
14. Co-ocurrencia de genotipos para las mutaciones V410L, V1016I y F1534C relacionada con la respuesta a bioensayos DD con permetrina en 10 poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	57

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mecanismos de resistencia asociados a piretroides	19
2. Canal de Sodio	20
3. Factores que afectan la selección de la resistencia a los insecticidas en las poblaciones de insectos.....	29
4. Localización de las 45 poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> donde se recopilaron frecuencias kdr	33
5. Frecuencias obtenidas de los genotipos para las 3 mutaciones en 45 poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	48
6. Genotipos de 10 poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> asociados a respuesta DD con permetrina	53
7. Genotipos de 10 poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> asociados a respuesta DD con deltametrina	55
8. Análisis espacial de susceptibilidad	58
9. Frecuencias de genotipos kdr en 45 poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de México	60
10. Relación entre genotipos y mortalidad a permetrina	61
11. Relación entre genotipos y mortalidad a deltametrina	61
12. Regresión lineal de la frecuencia alélica de individuos sobrevivientes a DD permetrina	62
13. Regresión lineal de la frecuencia alélica de individuos sobrevivientes a DD deltametrina	63

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
ADN	Acido desoxirribonucleico
cADN	Acido desoxirribonucleico codificante
bt	botella
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CL50	Concentración Letal Cincuenta
DD	Dosis Diagnóstico
et al.	Y colaboradores
h	horas
IDW	Inverse Distance Weighting (Ponderación de Distancia Inversa)
kdr	resistencia al derribo o knock down
km	kilometros
m	metros
ml	mililitros
Min	Minutos
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
MRI	Manejo de la Resistencia a Insecticidas
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds Ratio
ND4	nicotinamida adenín dinucleótido subunidad 4
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PyR2	Receptor a piretroides 2
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
RI	Resistencia a Insecticidas
Rpm	revoluciones por minuto
SIG	Sistemas de Información Geográfica

SNP	Polimorfismo de un solo nucleotido
V _{gsc}	Canal de sodio dependiente de voltaje
®	Marca registrada

RESUMEN

Las estrategias actuales para suprimir los brotes de arbovirus incluyen la eliminación de los sitios de reproducción de larvas y tratamiento con insecticidas contra poblaciones de larvas y mosquitos adultos. El control de *Ae. aegypti* por medio de insecticidas es un desafío, debido a un rápido aumento en la resistencia knockdown (*kdr*) a los insecticidas piretroides. La identificación espacial de los focos de resistencia *kdr* proporcionan una alternativa altamente factible para que el personal de vectores en las entidades federativas a través del programa nacional de control de vectores, enfoquen las acciones de selección de insecticidas con base en las áreas de alto riesgo de resistencia identificadas como sitios focales. En el presente estudio se determinó el patrón de distribución espacial de la frecuencia de resistencia *kdr* a piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* de la costa del pacifico y sureste de México. Se recolectaron poblaciones del mosquito de la costa del pacifico y sureste del país y se realizaron bioensayos con dosis diagnóstico (DD) de los insecticidas permetrina (piretroide tipo I) y deltametrina (piretroide tipo II) en cada población, para determinar la frecuencia de resistencia. Posteriormente, los resultados de los bioensayos se correlacionaron con las frecuencias de las mutaciones V410L, V1016I y F1534C obtenidas por PCR cuantitativa. Todas las poblaciones de *Ae. aegypti* resultaron con alta frecuencia de resistencia a la permetrina, con los mayores focos de resistencia en las poblaciones de los estados de Veracruz, Tabasco, Guerrero y Sinaloa. El 40% de las poblaciones resultaron con alta frecuencia de resistencia a deltametrina, el 28% con moderada y el 32% resultaron susceptibles, con el mayor foco de resistencia en poblaciones del estado de Tabasco. El genotipo más frecuente fue el VL/VI/CC seguido por el triple resistente LL/II/CC. Los focos de mayor resistencia a la permetrina se asociaron de manera significativa con el genotipo triple resistente (LL/II/CC), sin embargo, para deltametrina los genotipos con mayor frecuencia fueron el triple resistente (LL/II/CC) y doble heterocigoto para 410 y 1016 y resistente para 1534 (VL/VI/CC). Nuestros resultados evidencian la presencia de focos de resistencia *kdr* asociados a la resistencia a piretroides tipo I y II en el mosquito *Ae. aegypti* en México. En términos de contribución con el sector público, encargado de los programas de control de vectores en México (CENAPRECE), nuestros resultados representan una herramienta para el manejo de la resistencia a insecticidas de este vector de arbovirosis en México.

ABSTRACT

Current strategies to suppress arbovirus outbreaks include removal of larval breeding sites and treatment with insecticides against populations of larvae and adult mosquitoes. Control of *Ae. aegypti* by insecticides is challenging, due to a rapid increase in knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. The spatial identification of the kdr resistance hotspots offers a highly feasible alternative for the vector personnel in the states through the national program of vector control to focus the insecticide selection actions based on the areas of high risk of resistance identified as focal sites. In the present study, the spatial distribution pattern of the frequency of kdr resistance to pyrethroids in populations of *Ae. aegypti* from the Pacific coast and southeastern Mexico was determined. Mosquito populations were collected from the Pacific coast and southeast of the country and bioassays were carried out with diagnostic doses (DD) of permethrin (pyrethroid type I) and deltamethrin (pyrethroid type II) insecticides in each population, to determine the frequency of resistance. Subsequently, the results of the bioassays were correlated with the frequencies of the V410L, V1016I and F1534C mutations obtained by quantitative PCR. All populations of *Ae. aegypti* showed a high frequency of resistance to permethrin, with resistance hotspots in the populations of the states of Veracruz, Tabasco, Guerrero and Sinaloa. 40% of the populations were with a high frequency of resistance to deltamethrin, 28% with moderate and 32% were susceptible, with resistance hotspots in populations of the state of Tabasco. The most frequent genotype was VL/VI/CC followed by triple resistant LL/II/CC. Resistance hotspots to permethrin were significantly associated with the triple resistant genotype (LL/II/CC), however, for deltamethrin the genotypes with the highest frequency were triple resistant (LL/II/CC) and double heterozygous. for 410 and 1016 and resistant for 1534 (VL/VI/CC). Our results show the presence of kdr resistance hotspots associated with resistance to type I and II pyrethroids in the *Ae. aegypti* in Mexico. In terms of contribution to the public sector, in charge of vector control programs in Mexico (CENAPRECE), our results represent a tool for managing the insecticide resistance of this arbovirus vector in Mexico.

1. INTRODUCCION

Aedes aegypti es una especie que coexiste con los humanos en las zonas urbanas y rurales, debido a los criaderos artificiales que estos ecosistemas generan, permitiendo que el ciclo de vida de los mosquitos ocurra, sin embargo, la presencia de *Ae. aegypti* aumenta el índice de las enfermedades causadas por los virus del dengue, chikungunya, Zika y fiebre amarilla, siendo el mosquito un vector para la diseminación de estas enfermedades (Imam et al. 2014). Las densidades de los mosquitos en las zonas de distribución se disminuyen con el uso de diferentes tipos de insecticidas químicos; lamentablemente el uso de estos compuestos ha causado que se seleccionen características genéticas que les permite a los mosquitos sobrevivir a las nuevas condiciones presentes en su hábitat. Hasta hoy se conocen cuatro tipos de resistencia: metabólica, morfológica, resistencia en el sitio blanco y resistencia del comportamiento (Corbel y N'Guessan 2013).

En la actualidad, la mayoría de las poblaciones de este vector en el mundo, presentan resistencia a los piretroides lo que trae como consecuencia un aumento en la población de mosquitos, los cuales, como vectores de diferentes virus mencionados anteriormente, aumentan la transmisión de las enfermedades causadas por éstos (Brito et al. 2013). Debido a que los métodos de control del mosquito establecidos inicialmente cada vez son más ineficaces, se requiere implementar diferentes métodos de control, sin embargo, para que esto suceda primero hay que conocer cómo ocurre la resistencia a los insecticidas, de allí la importancia en los estudios sobre la resistencia en el sitio blanco que han surgido en poblaciones de *Ae. aegypti* (Corbel y N'Guessan 2013).

Hasta ahora se han encontrado trece mutaciones *kdr* en poblaciones de *Ae. aegypti*, en todo el mundo, Se identificaron por primera vez las mutaciones G923V, L928W, I1,011M y V1,016G (Bregues et al. 2003), I1,011V y V1,016I (Saavedra-Rodriguez et al. 2007), D1,763Y (Chang et al. 2009.), S989P y F1,534C (Srisawat et al. 2010; Yanola et al. 2011), T1520I (Kuswah et al. 2015), V410L (Haddi et al. 2017), V419L (Granada et al. 2018), y F1534L (Kushwah et al. 2019). Por lo general, las mutaciones *kdr* están localizadas en áreas geográficas específicas y comúnmente la presencia de ciertas mutaciones al mismo tiempo es asociada con altos niveles de resistencia (Du et al. 2013); por ejemplo, la mutación V1016G ha sido descrita en el Sureste asiático, pero no en el continente americano (Fernando et al. 2018).

Hasta hoy sabemos que las mutaciones V410L, V1016I y F1534C se encuentran ampliamente distribuidas en poblaciones de *Ae. aegypti* de México (Aponte et al. 2013; Vera-Maloof et al. 2015; López-Monroy et al. 2018; Saavedra-Rodríguez et al. 2018; Villanueva-Segura et al. 2020), las cuales ha evolucionado concomitantemente debido a la presión de selección con insecticidas piretroides por más de 20 años (Chang et al. 2012; Brito et al. 2013, Grossman et al. 2018; Vera-Maloof et al. 2019).

Dicho esto, aunado a las graves repercusiones que conllevan las epidemias de las enfermedades causadas por este vector, hacen necesario el desarrollo y la elaboración de estrategias de control pues la implementación oportuna del manejo de la resistencia a los insecticidas (MRI) es crucial para preservar la efectividad de los insecticidas utilizados por el área de salud pública y mantener el control de los vectores de arbovirus. La detección de la resistencia a insecticidas antes de que tengan un impacto operacional, permite aplicar diversas estrategias de MRI con base en la especie blanco, tipo de mecanismo de resistencia, el grado de resistencia que presente la población y la presión de selección existente en el lugar. En este estudio nos enfocamos en la resistencia *kdr* por V410L, V1016I y F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti* distribuidas en el territorio mexicano y localizaremos los puntos focales de resistencia, y con base en bioensayos dosis diagnóstico (DD) con dos insecticidas piretroides, de las mismas poblaciones se generó una extrapolación geográfica confiable sobre la distribución de resistencia a los insecticidas piretroides.

2. ANTECEDENTES

2.1 El vector *Aedes aegypti* L.

La especie de *Ae. aegypti* proviene del continente africano en el cual existen tres variantes de mosquitos, *Ae. aegypti aegypti* (forma típica), *Ae. aegypti queenlandensis* y *Ae. aegypti formosus*. De las cuales solo las primeras dos se encuentran en América, siendo la primera variante la más habitual en México (Nelson 1986; Icaza 2003). *Ae. aegypti* se distribuye permanentemente entre los 35° de latitud norte y 35° de latitud sur, pero puede extenderse hasta los 45° norte y hasta los 40° sur. Se han encontrado una densidad moderada de mosquitos a los 1,700 m, y en menor proporción en rangos de 1,700 a 2,130 m sobre el nivel del mar (Lozano-Fuentes et al. 2012). Las regiones donde se encuentra son: África, Suramérica, Centroamérica, en el sur de Norteamérica, Medio Oriente, Sureste de Asia, Islas del Pacífico y de la India, Norte de Australia y en Europa esporádicamente (Smith y Scott 2016; Gil et al. 2010).

Actualmente *Ae. aegypti* se considera el principal vector de enfermedades como dengue, chikungunya, Zika, fiebre Amarilla y Mayaro en América, por lo que es importante el control de su presencia en las zonas urbanas y disminuir el riesgo de contagio de las personas, ya que cada vez aumenta la incidencia de personas contagiadas por alguna enfermedad transmitida por mosquito, de igual forma la expansión geográfica ha ido en aumento. Es por ello la importancia de reducir la densidad de población de *Ae. aegypti* a como sea posible, se han realizado estudios enfocados a conocer la distribución espaciotemporal del mosquito y su relación con los factores del clima, como base para medir el riesgo de dispersión de la enfermedad (García et al. 2011).

2.2 Resistencia a insecticidas piretroides en *Ae. aegypti*

El uso constante e indiscriminado de insecticidas trae, entre otras consecuencias, el aumento en la resistencia a estos en las poblaciones tratadas, incluso sin haber sido expuestas a algunos de insecticidas. Esta resistencia puede ser definida como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la acción tóxica de un insecticida y, en consecuencia, sobrevivir a la exposición de dosis que para otros sería letal (Che-Mendoza et al. 2015).

El desarrollo de tal resistencia es un proceso complejo y dinámico dependiente de múltiples factores (Nauen, 2007). Por lo que el manejo de esta requiere dos tipos de información: buen conocimiento de los mecanismos de resistencia y un programa de monitoreo de la misma. La caracterización de los mecanismos de resistencia involucrados nos permite apreciar y predecir su impacto en las estrategias de control de vectores. Mientras que el tener un monitoreo rutinario de la resistencia a insecticidas en las poblaciones de vectores naturales nos ayuda a detectar la resistencia temprana y mejorar la eficacia de las estrategias de control operacional (Che-Mendoza et al. 2015).

De entre los métodos utilizados en el monitoreo de la resistencia se encuentran los ensayos biológicos (métodos OMS y CDC), ensayos con sinergistas, pruebas bioquímicas y moleculares, las cuales en conjunto permiten determinar cuál insecticida se debería usar para controlar la población de un vector en caso de detectar resistencia (Brogdon y Chan 2010).

La resistencia puede deberse a dos mecanismos principales: la sobreexpresión de enzimas degradativas y/o la insensibilidad en el sitio de acción (Figura 1), de acuerdo con Álvarez et al. (2015). Siendo el mecanismo asociado a enzimas de desintoxicación identificado ampliamente en poblaciones de *Ae. aegypti* de distintas regiones de México (Flores et al. 2005, 2009, 2013). Destacándose los mecanismos asociados a esterasas, glutatión S-transferasas y oxidasas de función múltiple. Por otro lado, mutaciones asociadas a la insensibilidad del sitio blanco de los insecticidas como resultado de la modificación estructural o mutación (mutación puntual) de genes que codifican proteínas diana que interactúan con insecticidas, ha ido evolucionando a durante los últimos años, específicamente las mutaciones V410L, V1016 y F1534C (López-Monroy et al. 2018; Saavedra-Rodríguez et al. 2018; Villanueva-Segura et al. 2020).

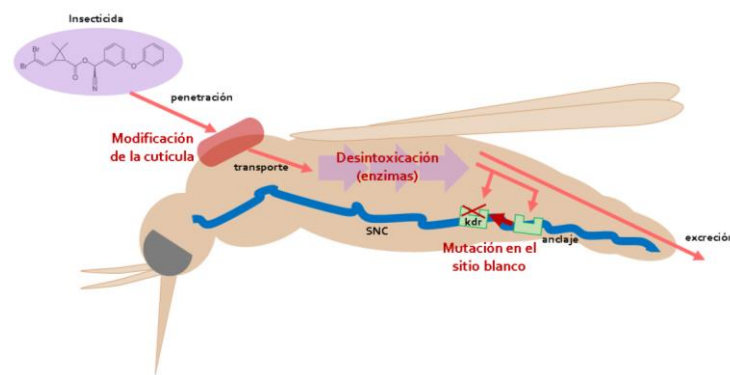


Figura 1. Mecanismos de resistencia asociados a piretroides. La molécula representada es la deltametrina (modificado de Nkya et al. 2013).

Recientemente Saavedra-Rodríguez et al. (2021) identificaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) asociados con cada fenotipo e identificaron genes que probablemente estén asociados con los mecanismos de resistencia a los piretroides en una colonia de *Ae. aegypti* de Tapachula, México, incluida la desintoxicación, la cutícula y los sitios blanco del insecticida. Ellos identificaron 192 SNP significativos en 23 genes asociados a *kdr* que codifican para sitios blanco de insecticidas; Se encontraron 70 SNP solo en *vgsc*. Con los mayores valores de asociación genética (LOD) en S679T y V410L en el *vgsc* (LOD = 13.7 y 12.25).

Los cambios en las proteínas de la cutícula pueden reducir la penetración de los insecticidas. Aproximadamente 88 SNP han sido identificados en esta categoría por Saavedra-Rodríguez et al. (2021). Los mayores LOD en la proteína de cutícula CP14.6 (LOC5577605, LOD = 6,46), en una proteína de cutícula no caracterizada (LOC5572415, LOD = 6,02) y en la proteína de cutícula 8 (LOC5565392, LOD = 5,89).

Saavedra-Rodríguez et al. (2021) reportaron que 295 SNP ubicados en 91 genes asociados a la desintoxicación difirieron significativamente en la comparación de mosquitos *kdr* vs recuperados. Un total de 280 SNP categorizados en 103 genes asociados a la desintoxicación se asociaron con la recuperación. 36 SNP no sinónimos se localizaron en 22 genes, con LOD que oscilaban entre 3.3 y 6.6.

2.3 Canal de sodio dependiente de voltaje

El sitio de acción de los piretroides, el canal de sodio dependiente de voltaje (Figura 2) se compone de 4 dominios (I, II, III y IV) y cada dominio consiste en seis hélices transmembranales (S1, S2, S3, S4, S5 y S6). Para conducir el estímulo eléctrico a lo largo del sistema nervioso, deben generarse potenciales de acción a través de la membrana. Los canales de sodio pasan por 3 fases o estados: cerrado, abierto e inactivado. El estado inactivo se da cuando la membrana se encuentra en potencial de reposo y el canal de sodio se encuentra cerrado. Durante la activación del canal la membrana se despolariza, causando la apertura del canal de sodio y la generación de un flujo de iones de sodio encontrados en el citoplasma. Después de un milisegundo, ocurre la inactivación debido al cambio conformacional del canal de sodio, bloqueando el paso de iones a través de la membrana. Cuando el potencial de membrana regresa al estado de reposo, el canal cierra nuevamente (Dong et al. 2014). A nivel celular, los piretroides interrumpen la función neuronal, causando descargas repetitivas, despolarización de la membrana, y disturbios sinápticos.

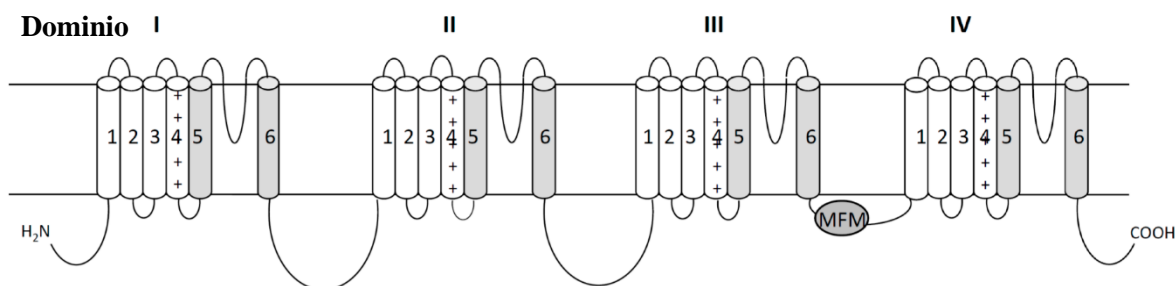


Figura 2. Canal de Sodio (modificado de Du et al. 2016).

2.4 Resistencia al derribo: mutaciones *kdr*

La resistencia al derribo (knock down resistance o *kdr*), se refiere al mecanismo de resistencia a piretroides y DDT, en el que los insectos no pierden inmediatamente coordinación debido a la reducción de la sensibilidad en el sistema nervioso de insecto después de la exposición al insecticida. Típicamente *kdr* no es afectado por sinergistas que inhiben esterasas y monooxigenasas, sino que surge a través de mutaciones no sinónimas en el gen transmembranal del canal de sodio dependiente de voltaje que reduce la unión del piretroide al

canal de sodio que pasa a través de la membrana de la célula nerviosa. *Kdr* normalmente limita la acción de los piretroides en diversos grados dependiendo de si el insecticida contiene un alcohol desciano-3-fenoxibenzilo (piretroide tipo 1) o un alcohol α -ciano-3-fenozibencilo (piretroide tipo 2). Por lo tanto, la detección de *kdr* en el campo tiene graves consecuencias para el uso sostenido de piretroides en el control del mosquito. La detección temprana y la caracterización de *kdr* es fundamental para el desarrollo de estrategias para el manejo de la resistencia (Saavedra-Rodríguez et al. 2007).

El primer gen del canal de sodio de insectos (gen *para*, después nombrado como DmNav) fue clonado de *Drosophila melanogaster* basados en mutaciones (Loughney et al. 1989). La estructura general y la secuencia del aminoácido de la proteína del gen DmNav tienen una alta similitud con las subunidades- α de los canales de sodio de los mamíferos.

En los años 90's la resistencia a los piretroides fue genéticamente ligada a las secuencias del gen DmNav-para en moscas y cucarachas (Soderlund 2005). Estos descubrimientos desencadenaron una serie de estudios que resultaron en el aislamiento parcial o total de cADN de DmNav de muchas plagas y vectores de enfermedades humanas. Recientemente, la secuenciación genética proporciona secuencias de genes de la familia DmNav de los canales de sodio de distintas especies de insectos.

La asociación entre *kdr* y modificaciones en el sitio de acción fueron confirmados por estudios con neurotoxinas y mapeo genético por primera vez en *Musca domestica* L (Bloomquist y Miller 1986). Donde una sola mutación en el segmento transmembrana 6 de dominio II (DIIS6), localizado en el cromosoma 3, causaba sensibilidad reducida a insecticidas piretroides (Williamson et al. 1996).

Rinkevich et al. (2013) publicó una revisión sobre la diversidad y convergencia de mutaciones *kdr* involucradas en la resistencia a piretroides en artrópodos. En dicho análisis reportan 30 mutaciones o combinaciones de mutaciones asociadas a resistencia y detectadas en más de una especie, así como, mutaciones que solo se han identificado en una sola especie. También mencionan que la mayoría de estas mutaciones reduce la sensibilidad a piretroides a los canales de sodio de mosca doméstica, cucaracha y *Drosophila*.

Dong et al. (2014) menciona que más de 50 mutaciones en el canal de sodio han sido identificadas como responsables o asociadas con la resistencia al derribo (*kdr*) causado por piretroides en varias especies de artrópodos plaga y vectores de enfermedades. De las cuales, 7 han sido descritas como mutaciones *kdr* en el gen *para* del canal de sodio en *Ae. aegypti* (V1016I, F1534C, I1011M, I1011V, V1016G, super *kdr* V1016G + S989P, y V1016G + D1763Y).

Recientemente Saavedra-Rodríguez et al. (2021) identificaron 88 SNP en 22 genes asociados a mosquitos *Ae. aegypti* recuperados después de 4h a ensayos de botella de 15µg/1h con permetrina. Se encontraron seis SNP no sinónimos en cuatro genes, incluida la subunidad alfa del receptor de acetilcolina (LOC5575838, LOD = 6,7), GPRGBB3 (LOD = 7,6 y 7,1) y la subunidad alfa-1 del canal de calcio dependiente del voltaje tipo A (VGCC, LOC5564339) con un LOD de 10,9. Así también las mutaciones S679T y V410L en *vgsc* con un LOD de 3.8 y 4.6, respectivamente.

2.5 Evolución de la resistencia *kdr* en México

En el año 2007 se reportó la primera mutación *kdr*, V1016I en *Ae. aegypti* (Saavedra-Rodríguez et al. 2007). Se demostró que esta mutación no estaba presente en los 1990's, basado en datos preliminares del análisis de ADN preservado de *Ae. aegypti* (Ponce-García et al., 2009), por lo que no representan un estudio sistemático de la evolución *kdr* en el espacio y el tiempo. Sin embargo, dentro del mismo análisis fue demostrado que la frecuencia de esta mutación se incrementó de 2-5% entre 2003-2006 del 38-80% entre el 2007 y 2009, para cinco estados de México: Nuevo León, en el norte, Veracruz, en la costa central del Atlántico, y Yucatán, Quintana Roo y Chiapas en el sur; coincidiendo con la aplicación continuada de una formulación con base en permetrina autorizada para el control de vectores en México (NOM- 032-SSA2-2002).

Posteriormente, Siller et al. (2011) reportó el aumento de la frecuencia de esta mutación llegando a fijarse en algunas poblaciones de *Ae. aegypti* de varias localidades de México. Para el 2013 una segunda mutación *kdr*, F1534C se reportó en poblaciones del mosquito en los estados de Guerrero y Yucatán, México (Aponte et al. 2013; Saavedra-Rodríguez et al. 2007).

Las dos mutaciones (F1534C y V1016I) en el gen para han evolucionado a la par en los últimos 17 años a tal grado que han logrado fijarse en la mayoría de las poblaciones de *Ae. aegypti* de México (Yanola et al. 2011; Ponce-García et al. 2009; Saavedra-Rodríguez, et al. 2007), el resultado de esta sustitución les confiere a los mosquitos resistencia de tipo kdr a los piretroides, reduciendo la unión de los piretroides a los receptores del canal de sodio dependiente de voltaje debido a mutaciones no sinónimas en la proteína transmembranal del mismo (Saavedra-Rodríguez et al. 2007). Esta coevolución también ha ido identificada en otros países del continente americano como son Brasil (Linss et al. 2014), Venezuela (Álvarez et al. 2015), Colombia (Maestre-Serrano et al. 2014), Puerto Rico (Ponce-García et al. 2016), Cuba (Bariami et al. 2012) y Jamaica (Francis et al. 2017).

La mutación *kdr* V410L ubicada en el segmento seis del dominio I del canal de sodio ha sido reportada en poblaciones de *Ae. aegypti* del este y sur de México colectadas en el año 2018 (Villanueva-Segura et al. 2020). De acuerdo con Saavedra-Rodríguez et al. (2018) la presencia simultanea de las mutaciones V410L, I1016 y C1534 en México, ha sido encontrada en poblaciones de *Ae. aegypti* en diversas poblaciones desde el año 2002. En los estudios de fenotipo y genotipo, los individuos con resistencia por triple homocigoto tienen mejor aptitud en presencia de piretroides, es decir, mayor posibilidad de sobrevivencia ya sea por resistencia “*knockdown*” o por capacidad de recuperación.

Concretando la evolución paralela de las mutaciones V410L, V1016I y F1534C en México (López-Monroy et al. 2018; Saavedra-Rodríguez et al. 2018; Villanueva-Segura et al. 2020). Si bien aún no se sabe exactamente porque V410L disminuye la sensibilidad del canal de sodio a la permetrina y deltametrina, debido a que a pesar de localizarse en DIS6 no forma parte del sitio del receptor PyR2, por lo que se cree que tiene relación con cambios en las propiedades de la puerta del canal sin inhibir el acoplamiento de la molécula (Saavedra-Rodríguez et al. 2018).

2.6 Variabilidad y flujo genético

En el territorio mexicano existe una amplia distribución de este vector, por tanto, la variabilidad y flujo genético que en este se encuentran es clave para el desarrollo y la elaboración de estrategias de control de *Ae. aegypti*. Mediante el uso de ADN mitocondrial el cual posee numerosas ventajas para el estudio de las relaciones evolutivas, Gorrochotegui-Escalante y colaboradores (2002) analizaron 38 colecciones de *Ae. aegypti* de México mediante un análisis de polimorfismo de conformación de cadena sencilla para detectar la variación en una región de 387 pb del gen de la nicotinamida adenín dinucleótido subunidad 4 (ND4), el cual ha demostrado ser un excelente marcador para el análisis de la estructura genética de la población y eventos de colonización de *Aedes aegypti* (Urdaneta-Marquez et al. 2008), encontrando 25 haplotipos diferentes de los cuales 7 se estuvieron presentes en poblaciones del noreste del país, 13 en poblaciones de la costa del pacífico y 19 en poblaciones de la península de Yucatán.

En este estudio (Gorrochotegui-Escalante et al. 2002) el flujo de genes parece ser moderado entre las poblaciones del noreste de México, así mismo, las poblaciones parecen no estar fuertemente aisladas por la distancia y la diversidad genética es baja. Por otra parte, en la península de Yucatán el flujo de genes es menor, las poblaciones están aisladas por la distancia y la diversidad genética varía mucho entre las poblaciones. Finalmente, entre las poblaciones costeras del Pacífico se encontró que el flujo de genes es grande y la diversidad genética es alta. Años después, fue reportada la cantidad de diversidad entre diferentes poblaciones de la ciudad de Oaxaca (Muñoz et al. 2013) siendo, en promedio, menor que entre todas las otras ciudades reportadas en México. En este mismo estudio se también se determinó que poblaciones de distintas ciudades de Oaxaca presentan 2 haplotipos de los 25 previamente reportados en 2002 (Gorrochotegui-Escalante et al.) y fue encontrado un nuevo haplotipo, sumando así 26 haplotipos distintos presentes en el país para el gen ND4.

En cuanto a la distancia a la que se encuentran las poblaciones reportadas por Gorrochotegui y Colaboradores (2002), el flujo libre de genes ocurrió entre todas las colecciones dentro, 130 km entre sí en el noreste y dentro, 180 km en Yucatán. En ese mismo año, se informó sobre los patrones locales de flujo de genes entre colecciones de *Ae. aegypti* en una distancia total de 914 km y entre 5 ciudades a una distancia de 62 km entre sí en colecciones de la costa del Pacífico sur de México utilizando marcadores aleatorios de ADN polimórfico

amplificado (RAPD) (García-Franco et al. 2002). Confirmando lo observado por Gorrochotegui et al. (2000), que a distancias mayores de 150–200 km, es difícil comparar poblaciones debido a que las bandas RAPD se fijan o se extinguen entre poblaciones distantes.

Por otro lado, estudios genéticos de población han demostrado que la intersección del eje Neovolcánico con la costa en el estado de Veracruz es una barrera para el flujo de genes en *Ae. aegypti* (Lozano-Fuentes et al., 2009; Gorrochotegui-Escalante et al. 2000). En conjunto, este tipo de estudios nos permiten ubicar donde se encuentra un mayor flujo de genes dependiendo la región, ahora bien, si se conociera este tipo de información sobre los genes de resistencia a los insecticidas se podría diseñar de forma estratégica un MRI dirigido hacia una población en particular con base en su localización. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que las posibles fallas en el control no dependen únicamente de la variabilidad genética.

2.7 Análisis espacial de resistencia a insecticidas en mosquitos

Se sabe que las condiciones climáticas, sociológicas y ambientales afectan la distribución espacial de los vectores y la transmisión de enfermedades. El uso intensivo de insecticidas en los sectores agrícola y de salud pública ejerce una fuerte presión selectiva sobre los genes de resistencia en los vectores. Tomando esto factores en cuenta es posible el desarrollo de modelos espaciotemporales de condiciones favorables para la presencia de especies de mosquitos para estimar la probabilidad de presencia de vectores y resistencia a insecticidas.

Este tipo de análisis han sido realizados para visualizar la situación de resistencia en vectores de malaria. Souris et al. (2017) en un estudio en Laos, se utilizaron modelos basados en condiciones ambientales y meteorológicas, y factores demográficos con este propósito. Mediante el uso de software de Sistemas de Información Geográfica (SIG) se construyó y administro una base de datos espacial con datos recopilados de varios proveedores de información geográfica. SIG también se utilizó para construir y ejecutar los modelos. Los resultados mostraron que el uso potencial de insecticidas y, por lo tanto, la probabilidad de resistencia al insecticida es mayor en la parte suroeste del país, específicamente en la provincia de Champasack y donde ya se sabe que la incidencia de malaria es alta. Estos hallazgos pueden ayudar a las autoridades nacionales a implementar estrategias específicas y efectivas de control de vectores para la prevención y eliminación de la malaria entre las poblaciones más expuestas.

En 2017 Coleman et al. utilizando datos de resistencia obtenidos de artículos publicados, contactando a autores y recopilando datos no publicados. Fueron desglosados en sitios individuales y períodos de recolección para proporcionar una resolución espacial fina. Incluyendo datos de 1955 a octubre de 2016 de 71 países endémicos de malaria y 74 especies de anofelinos. Los datos incluyen cuatro clases de insecticidas (6 carbamatos, 5 organoclorados, 16 organofosforados y 8 piretroides) y los mecanismos de resistencia asociados. Este permitió concluir que la resistencia es un fenómeno que evoluciona rápidamente y los recursos y la capacidad humana para monitorear continuamente grandes cantidades de poblaciones de mosquitos en numerosos lugares simultáneamente no están disponibles.

Este trabajo ha demostrado que los volúmenes de datos de los resultados del bioensayo de susceptibilidad a insecticidas son suficientes para permitir un análisis de las tendencias espaciotemporales que generarán mapas regionales y proporcionarán predicciones modeladas para todas las ubicaciones, en una alta resolución.

Moyes et al. (2019) generaron una serie de datos geoespaciales para la resistencia a los insecticidas en los vectores de la malaria, de modo que se puedan cuantificar las tendencias de la resistencia en el tiempo y en el espacio, para evaluar el impacto de la resistencia en las poblaciones silvestres que conducen a la transmisión de la malaria en África.

Específicamente, los datos recopilados para determinar la prevalencia de resistencia a los insecticidas fueron resultados de bioensayos estándar, en muestras representativas de especies individuales o complejos de especies de *Anopheles gambiae*, el subgrupo *Anopheles funestus* y para nueve especies de vectores individuales. También se proporcionaron datos de marcadores genéticos comunes de resistencia para respaldar el análisis de si estos marcadores pueden mejorar la capacidad de controlar la resistencia en entornos de bajos recursos, así como frecuencias alélicas para marcadores asociados a resistencia conocidos en el canal de sodio dependiente de voltaje (V_{gsc}). En total, se recopilaron ocho conjuntos de datos estandarizados y preparados para el análisis que abarcaron más de 20,000 colecciones de mosquitos africanos entre 1957 y 2017. Estos datos de distribución del vector permitieron respaldar una variedad de análisis de resistencia a insecticidas en vectores de malaria en África, mismos que se han compartido con la Asociación Panafricana de Control de Mosquitos para apoyar el establecimiento de un recurso de datos gestionado y dirigido por este país.

En el caso del vector del dengue, Chediak et al. (2016) analizaron la propagación espacial y temporal de la resistencia al temefos en larvas de *Ae. aegypti* en Brasil durante 12 años, utilizando concentraciones discriminantes de temefos y los protocolos de bioensayo de la OMS. Los resultados de mortalidad obtenidos se sometieron a un análisis espacial para la interpolación a distancia utilizando modelos de semi-varianza para generar mapas que representan la propagación de la resistencia al temefos en Brasil desde 1999. Como resultado se visualizó la expansión de la resistencia a lo largo del tiempo, desde 2002-2003, aproximadamente la mitad del país había exhibido poblaciones de mosquitos resistentes al temefos.

La frecuencia de la resistencia al temefos y, probablemente, las fallas de control, que comienzan cuando el nivel de mortalidad por efecto del insecticida cae por debajo del 80%, aumentó más desde el 2004. En pocas regiones de Brasil se logró alcanzar el umbral de eficacia objetivo del 80% para 2010/2011, resultando en un riesgo significativo de falla de control por temefos en la mayor parte del país. La resistencia generalizada al temefos en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Brasil comprometen en gran medida los esfuerzos efectivos de control de mosquitos usando este insecticida, permitiendo demostrar la urgente necesidad de identificar insecticidas alternativos.

El aumento de la resistencia a los insecticidas (RI) es una amenaza importante para los programas de control de vectores establecidos, que pueden fallar si los insecticidas de uso común se vuelven ineficaces. Las autoridades de salud pública en la costa sur de Ecuador, una región de alto riesgo para enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti*, anteriormente tenían información limitada sobre el estado de los RI en las poblaciones locales de mosquitos. Ryan y su equipo de investigación (2019) presentaron la primera evaluación de RI en adultos de *Ae. aegypti* a insecticidas (deltametrina, malatión y alfa-cipermetrina) utilizados habitualmente en el control de vectores de salud pública en cuatro ciudades a lo largo de la costa sur de Ecuador. El patrón de RI observado difería entre las ciudades y las estaciones del muestreo de mosquitos, lo que sugiere que el estado de RI puede fluctuar en el espacio y el tiempo. Ya que la RI es un componente integral de los servicios de control de vectores, conocer este tipo de información permite implementar estrategias de gestión alternativas cuando se detecta RI.

2.8 Manejo de resistencia a insecticidas

El manejo de Resistencia a Insecticidas (MRI) tiene como objetivo prevenir la emergencia, desacelerar su evolución o revertir la resistencia a insecticidas empleando estrategias compatibles con un control vectorial eficiente y con un limitado efecto en el medio ambiente. Debido a que el panel de insecticidas disponibles para salud pública es limitado, es importante mantener la eficacia de los ingredientes activos que ya existen y los futuros. Para este propósito, se requiere la implementación de un MRI de manera oportuna (Dusfour et al. 2019).

La frecuencia de resistencia a los insecticidas en una población es un proceso adaptativo impulsado por la selección natural que varía en el espacio y el tiempo bajo el control de factores biológicos, genéticos y ambientales (Figura 3). Sin embargo, la resistencia puede ser el resultado de mutaciones *de novo*, en bajas probabilidades, y la resistencia común en una población proviene de la constante variación genética, por ejemplo, la selección de un alelo resistente, o por la introducción de un individuo con alelos resistentes a través de migración o transportación desapercibida por los seres humanos (French-Constant 2013; Muñoz et al. 2013; Raymond et al. 2001).

El éxito de un MRI estriba en la reducción de fuentes de presión de insecticidas, principalmente control vectorial, posteriormente el ejercido por parte de la agricultura y uso doméstico (Nkya et al. 2014), por lo cual, el constante monitoreo de la resistencia a insecticidas mediante ensayos biológicos y moleculares, así como la evaluación en la falla del control vectorial son actividades clave para el MRI (Guedes 2017).

La respuesta comúnmente utilizada de los programas de control a la resistencia al *Aedes* es cambiar el insecticida una vez que los tratamientos se vuelven menos efectivos o incluso ineficaces. Las estrategias que se incluyen son la rotación de insecticidas, mosaicos (alternancia espacial) y la combinación con uso de alternativas no químicas para el manejo integrado de vectores, pero ha habido escasas pruebas de diferentes estrategias de eficacia en poblaciones de *Aedes* y mosquitos en general (Hougard et al. 2003; Darriet y Chandre 2013).

Todas las comparaciones con mosaico, rotación o combinación basadas en modelos teóricos o estudios empíricos demuestran que la "alternancia reactiva" tiene un rendimiento

inferior al de los otros enfoques de MRI para desacelerar la evolución de la resistencia porque la alternancia se implementa demasiado tarde, cuando los alelos de resistencia ya están en alta frecuencia (Dusfour et al. 2019), por lo que es requerida una investigación operacional que evalúe estrategias de control vectorial en condiciones de campo y la resistencia genética en términos generales (relaciones genotipo-fenotipo, comportamiento del mosquito), con un enfoque experimental que evalúe la probabilidad de falla de control de un insecticida que permita una toma de decisiones consistente con respecto al manejo de la resistencia a los insecticidas.

Esto necesariamente requiere un muestreo de población vasto, con el objetivo de utilizar el análisis espacial en búsquedas de área amplia, para reconocer los puntos focales de resistencia a los insecticidas y / o fallas de control que mejorarán los esfuerzos del manejo. Considerando la distancia entre los sitios de muestreo, siguiendo la máxima de que cuanto más cercanas están las dos cosas, más se parecen, es la base de la Primera Ley de Geografía de Tobler (Guedes 2017).

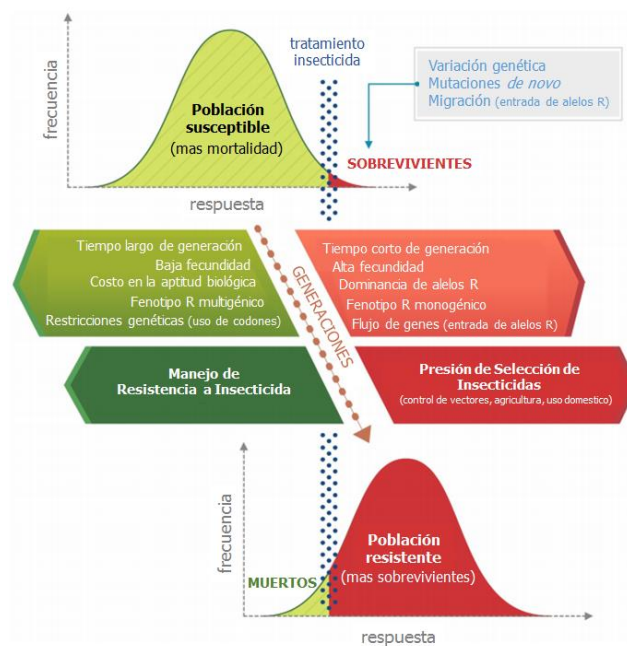


Figura 3. Factores que afectan la selección de la resistencia a los insecticidas en las poblaciones de insectos. (Modificado de Dusfour et al. 2019).

3. JUSTIFICACION

Los ensayos biológicos son comúnmente las pruebas de primera línea porque pueden revelar la prevalencia o el nivel de resistencia fenotípica. Son esenciales en la elección de la estrategia de control y qué insecticidas alternativos usar. Sin embargo, los bioensayos carecen de sensibilidad para detectar cambios en la susceptibilidad y a menudo detectan resistencia solo cuando la frecuencia de alelos resistentes ya es alta, especialmente si la resistencia es recesiva (por ejemplo, mutaciones kdr).

Las herramientas de diagnóstico molecular de alto rendimiento asociadas con los ensayos biológicos pueden proporcionar datos clave para identificar las causas de la resistencia a fin de implementar estrategias adecuadas de manejo de la resistencia (Hemingway et al. 2013). En teoría, la detección de alelos de resistencia antes de que la resistencia operativa pueda diagnosticarse mediante bioensayos, o el fracaso de la intervención puede facilitar el manejo de la resistencia al indicar la necesidad de un cambio de herramienta de control de vectores antes de que los alelos de resistencia alcancen la fijación. Las herramientas moleculares pueden ayudar a elegir el mejor insecticida alternativo, conociendo los patrones de resistencia cruzada asociados con algunos alelos de resistencia.

La identificación espacial de los focos de resistencia kdr proporcionan una alternativa altamente factible para que el personal de vectores en las entidades federativas a través del Programa Nacional enfoque las acciones de selección de insecticidas con base en las áreas de alto riesgo de resistencia identificadas como sitios focales.

En términos de la contribución científica, la presente propuesta contribuye a responder preguntas básicas y generar nuevas hipótesis con respecto a los patrones espaciales de los focos de resistencia kdr en *Ae. aegypti* en México.

4. HIPOTESIS

Existe asociación espacial entre las frecuencias de los genotipos resistentes de las mutaciones kdr V410L, V1016I y F1534C en *Aedes aegypti* y las áreas de mayor frecuencia de resistencia a insecticidas piretroides.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar el patrón de distribución espacial de la frecuencia de resistencia kdr a piretroides en poblaciones de *Aedes aegypti* de la costa del pacífico y sureste de México

5.2 Específicos

- Analizar la frecuencia de 3 mutaciones kdr V410L, V1016I y F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) de México y su relación con la respuesta a ensayos dosis diagnóstico con dos diferentes tipos de insecticidas piretroides (permetrina y deltametrina).
- Determinar la asociación espacial de la frecuencia de alelos de resistencia kdr en *Ae. aegypti* de la vertiente del golfo y del pacífico de México.
- Validar la co-ocurrencia de alelos de resistencia kdr con altas frecuencias de resistencia a piretroides medida como mortalidad menor a 90% en bioensayos con dosis diagnóstico de permetrina y deltametrina.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico

Se recopilieron las frecuencias de 45 poblaciones de *Ae. aegypti* distribuidas en 15 estados de la república (Figura 4) y de estas mismas se seleccionaron 25 poblaciones (Tabla 1) distribuidas perimetralmente en el territorio mexicano, las cuales fueron sometidas a bioensayos con dosis de diagnóstico (DD) usando insecticidas piretroides tipo 1 (permetrina) y tipo 2 (deltametrina). De las 25 poblaciones sometidas a bioensayo se consideraron 10 poblaciones, de las cuales los individuos tanto vivos como muertos fueron separados y posteriormente fueron genotipificados individualmente para las tres mutaciones mencionadas anteriormente.



Figura 4. Localización de las 45 poblaciones de *Ae. aegypti* donde se recopilieron frecuencias kdr

Tabla 1. Listado de poblaciones de *Ae. aegypti* y ubicación geográfica, sometidas al análisis de predicción espacial

Población		Longitud			Latitud			Grados	
		°	'	“	°	'	“	Longitud	Latitud
Zona Libre	ⓓ	18	29	6.8	88	23	36.5	18.4852222	88.3934722
Campeche		19	49	37.39	90	33	6.08	19.8270528	90.5516894
Champutón		19	21	51.78	90	43	17.70	19.364385	90.7215836
Cd. Carmen		18	39	40.12	91	49	32.06	18.6611464	91.8255733
Monterrey	ⓓ●	25	42	24.9	100	21	8.6	25.7069167	100.352389
Guadalupe		25	38	56	100	10	49.2	25.6488889	100.180333
Heroica Cárdenas		18	32	14.77	92	38	25.52	18.5374361	92.6404222
Frontera		17	59	18.13	92	55	55.32	17.9883694	92.9320333
Villahermosa	ⓓ	17	59	58.18	93	21	24.93	17.9994944	93.356925
Tampico	ⓓ	22	6	38.12	97	48	11.3	22.11059	97.8031389
Cancún	ⓓ	21	8	28.65	86	52	43.04	21.1412917	86.8786222
Felipe Carrillo		19	33	37.07	88	2	39.14	19.5602972	88.0442056
Chetumal		18	30	2.260	88	17	12.81	18.500628	88.2868934
Cardel	ⓓ	19	23	4.728	96	22	44.47	19.3846467	96.3790217
Emilio Carranza	ⓓ	19	58	26.50	96	36	26.59	19.9740292	96.6073875
Poza Rica	ⓓ	20	30	18.98	97	28	1.02	20.5052733	97.4669506
Cosolecaque	ⓓ	18	0	22.42	94	37	43.95	18.0062292	94.6288761
Minatitlán	ⓓ	18	1	10.10	94	32	52.55	18.0194736	94.5479331
Acayucan		17	57	5.52	94	53	57.90	17.9515358	94.8994189
Coatzacoalcos	ⓓ	18	4	31.89	94	19	15.99	18.0755253	94.3211108
Mérida	ⓓ	20	56	17.83	89	33	42.78	20.9382861	89.5618844
San Antonio Kaua		20	56	28.86	89	33	46.36	20.9413519	89.5628803
Umán		20	53	12.08	89	45	4.87	20.88669	89.7513531
Vergel	ⓓ	20	57	16.48	89	34	17.95	20.9545783	89.5716547
Valladolid		20	41	26.71	88	12	11.04	20.6907547	88.2030678
Chiapas		16	45	2	93	7	4	16.7505556	93.1177778
Acapulco	ⓓ●	16	53	7.19	99	50	23.54	16.8853306	99.8398722
Coyoacán		17	0	9.18	100	4	46.23	17.00255	100.079508
Zihuatanejo	ⓓ●	17	39	1.85	101	31	50.77	17.6505139	101.530769
Tecomán		18	54	50	103	53	10	18.9138889	103.886111
Manzanillo		19	7	55	104	20	49	19.1319444	104.346944

Colima		19	14	45.32	103	42	26.59	19.2459222	103.707386
José María Morelos	DD●	19	40	19.07	105	10	17.18	19.6719639	105.171439
Puerto Vallarta		20	31	51.5	105	17	31	20.5309722	105.291944
Compostela		21	7	13.6	105	17	31	21.1204444	105.291944
San Blas	DD●	21	32	28.1	105	17	18.3	21.5411389	105.288417
Mazatlán	DD	23	11	45.5	106	27	54.2	23.1959722	106.465056
Guasave	DD●	25	33	1.3	108	27	116	25.5503611	108.482222
La Paz	DD●	24	8	29.9	110	16	34.1	24.1416389	110.276139
Cd. Constitución		25	1	5.5	111	38	58.7	25.0181944	111.649639
Loreto	DD	26	1	4.98	111	21	8.96	26.01805	111.352489
San Luis Río Colorado	DD●	32	26	59.8	114	43	38.5	32.4499444	114.727361
Muzquiz	DD	27	53	30.18	101	31	43.87	27.8917167	101.528853
Piedras Negras		28	40	1.09	100	55	19	28.66697	100.921944
Acuña	DD	29	18	25.10	100	55	19	29.3069739	100.921944

DD Seleccionada para DD; ● Seleccionada para análisis de correlación genotipo-fenotipo

6.2 Bioensayos

Los bioensayos se realizaron siguiendo el protocolo de Brogdon y McAlister (1998). Estos se realizaron en botellas Wheaton® de 250 ml recubiertas con 15µg/botella de insecticida permetrina como piretroide tipo 1 y 10µg/botella de insecticida deltametrina como piretroide tipo 2, siendo esta la dosis-diagnóstico de cada uno de los insecticidas. Posteriormente se agregó a cada botella 1 ml de acetona como solución disolvente, las botellas se taparon y agitaron suavemente por rotación. Una vez garantizada una cubierta uniforme de la solución, se dejaron secar durante 24h en un lugar oscuro a 24 °C.

Se prepararon cuatro réplicas de cada insecticida individualmente (permetrina y deltametrina) con una dosis diagnóstico (DD) y una botella control (solo solvente). Veinticinco hembras adultas de *Ae. aegypti* se transfirieron a cada botella de prueba/control utilizando un aspirador. Se sometieron a prueba un máximo de 100 mosquitos (25 x 4 réplicas) para cada insecticida en cada DD más una botella control con 25 mosquitos, para cada una de las 25 poblaciones seleccionadas (Tabla 1).

6.3 Extracción de ADN en mosquitos

Se extrajo el ADN individualmente de 30 mosquitos adultos hembra de cada una de las 45 poblaciones de *Ae. aegypti* mediante la técnica de extracción de sales modificada de Coen et al. (1982), la misma técnica fue utilizada para 100 mosquitos hembra de las 10 poblaciones seleccionadas sometidas previamente a DD (Tabla 1). La genotipificación se realizó por separado en los individuos que sobrevivieron y murieron al ser sometidos a la DD de cada insecticida.

Los mosquitos fueron macerados individualmente en 100µl de buffer de extracción (0.1M NaCl, 0.2M sacarosa, 0.1 Tris-HCl pH 9.1, 0.005M EDTA y 0.5% de dodecilsulfato de sodio- SDS) utilizando pistilos Kontex en tubos eppendorf de 1.5ml. Se centrifugaron durante 5 min a 13,000 rpm y se incubaron durante 30 minutos a 65°C. Transcurrido este tiempo se agregó a cada tubo 15µl de acetato de potasio y se colocaron a -20°C por al menos 30min con la finalidad de que precipite el SDS. Posteriormente se centrifugo a 14,000 rpm durante 15 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo donde se realizaron los lavados con 200 µl de etanol al 100% y 70%. Una vez obtenido el pellet de ADN, los tubos se dejaron secar por 10 minutos a 65°C y se resuspendieron en 30µl de agua bidestilada ultrapura y se determinó la pureza en un equipo NanoDrop 2000 spectrophotometer.

Las muestras fueron almacenadas a -20°C para la posterior genotipificación de cada una de las mutaciones descritas previamente por medio de PCR alelo específica.

6.4 Amplificación de alelos específicos de las mutaciones kdr por PCR cuantitativa.

Para obtener la frecuencia de los alelos que causan la resistencia kdr en los loci 410, 1016 y 1534 del canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc) se utilizaron las condiciones y primers (Tabla 2) reportados por Saavedra et al. (2018, 2007) y Yanola et al. (2011) respectivamente.

Tabla 2 Primers utilizados para la detección de la mutación kdr I1016V, C1534F Y V410L

Mutación	primer	Secuencia de 5' a 3'	Autor
V410L	V410 F	GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CC ATCTTCTTGGGTTCGTTCTACCGTG	Saavedra- Rodríguez et al., 2018
	L410 F	GCG GGC ATCTTCTTGGGTTCGTTCTACCATT	
	410 R	TTCTTCCTCGGCGGCCTCTT	
I1016V	Val1016 F	GCGGGCGGCGGGGGCGGGGCC ACAAATTGTTTCCACCCGCACCGG	Saavedra- Rodríguez et al., 2007
	Ile1016 F	GCGGGCACAAATTGTTTCCACCCGCACTGA	
	Ile1016 R	TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC	
C1534F	C1534-f	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCTCT ACTTGTGTTCTTCATCATGTG	Yanola et al., 2011
	F1534-f	GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT	
	CP-r	TCTGCTCGTTGAAGTTGTTCGAT	

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para cada una de las tres mutaciones individualmente se llevaron a cabo como se describe a continuación, en un tubo de 1.5ml se preparó un master mix, cuyo contenido por reacción fue: 10 µl de SYBER Green supermix (Bio-Rad 170-8880), seguido de 13.85 µl de H₂O libre de nucleasas (NFW), posteriormente se añadió 1 µM de cada uno de los primers (según la mutación a detectar), consultar Tabla 2, se mezcló por pipeteo. Después se utilizó una tira de ocho tubos (MicroAmp Optical 8-Tube Strip, 0.2 ml), donde se colocaron 24 µl del master mix en cada tubo de la tira seguido de 1 µl de ADN genómico de mosquito (~25 ng). La tira fue cerrada con tapas en tiras (MicroAmp Optical Cap Strips) y luego se llevó a una centrifuga de tiras (Heathrow Scientific Sprout® mini centrifuge) por 2 minutos para asegurar la reacción de PCR en el fondo del pozo. Doce tiras fueron colocadas en un termociclador Step One Plus con las siguientes con los siguientes programas de temperaturas de acuerdo con cada mutación.

Para la mutación V410L 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 20 segundos a 56°C y 20 segundos a 72°C; para la mutación 1016, 4 minutos a 95°C, 30 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Para la mutación 1534, 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, en los tres casos se realizó posteriormente una curva de disociación que constó de incrementos de 0.2 °C desde 65°C hasta 95°C durante 10 segundos.

6.5 Análisis de resultados

6.5.1 Bioensayos

El porcentaje de mortalidad obtenido al someter los individuos de cada una de las poblaciones a la DD correspondiente de cada insecticida fue registrado. Con base en este valor se utilizó el criterio de OMS (2016) para categorizar la frecuencia de resistencia de la siguiente manera: un porcentaje de mortalidad mayor o igual a 98% se consideró que la población fue susceptible al insecticida, de 97 a 90% probable resistencia y menor a 90% resistencia confirmada.

6.5.2 Mutaciones kdr

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de las 45 poblaciones de *Ae. aegypti* para las mutaciones V410L, V1016I y F1534C. Las frecuencias genotípicas (f) fueron calculadas dividiendo el número de mosquitos con el genotipo a calcular entre el total de mosquitos analizados:

Frecuencia del genotipo homocigoto susceptible para cada una de las mutaciones: V410/V410, V1016/V1016, F1534/F1534:

$(f_{\text{susceptible}}) = \text{Número de mosquitos (homocigotos susceptibles)} / \text{Número total de mosquitos analizados}$

Frecuencia del genotipo homocigoto resistente para cada una de las mutaciones: V410/V410, V1016/V1016, F1534/F1534:

$(f_{\text{resistente}}) = \text{Número de mosquitos (AA)} / \text{Número total de mosquitos analizados}$

Frecuencia del genotipo heterocigoto V410/I410, V1016/I1016, F1534/C1534

$(f_{\text{heterocigoto}}) = \text{Número de mosquitos (heterocigotos)} / \text{Número total de mosquitos analizados}$

Las frecuencias alélicas se calcularon al sumar la frecuencia genotípica de los heterocigotos entre dos más la frecuencia de los homocigotos:

Frecuencia alélica de V410, V1016, F1534.

$$p = f_{\text{susceptible}} + (f_{\text{heterocigoto}} / 2)$$

Frecuencia alélica de L410, I1016, C1534.

$$q = f_{\text{resistente}} + (f_{\text{heterocigoto}} / 2)$$

Se calculó la prueba de X^2 para comprobar si las poblaciones evaluadas se encontraban en Equilibrio Hardy-Weinberg.

6.5.3. Análisis de co-ocurrencia de mutaciones kdr

Se generó una base de datos con los genotipos de cada una de las mutaciones por individuo de las 45 poblaciones de *Ae. aegypti*, se registró el genotipo de la coocurrencia de las tres mutaciones por cada individuo, siendo 1350 individuos analizados, posteriormente se creó una base de datos con las frecuencias de los 22 genotipos encontrados.

Así también se generó una base de datos con los genotipos de cada una de las mutaciones por individuo de 10 poblaciones de *Ae. aegypti* sometidas previamente a bioensayo DD, se registró el genotipo de la coocurrencia de las tres mutaciones por cada individuo, siendo 974 individuos expuestos a deltametrina y 942 individuos en el caso de permetrina, posteriormente se creó una base de datos con las frecuencias de los 16 genotipos encontrados en las poblaciones expuestas a deltametrina y 17 genotipos en las expuestas a permetrina. En todos los casos se crearon gráficos de barras para mejor visualización de los resultados.

6.5.4 Asociación fenotipo-genotipo

Se generó una base de datos utilizando las mediciones realizadas, clase de fenotipo (pruebas de botella) y genotipo (frecuencia de genotipo resistente para cada mutación). Se llevó a cabo un análisis de asociación fenotipo-genotipo por medio de la razón de momios (OR) y se calculó la significancia estadística con la prueba de probabilidad exacta de Fisher ($p \leq 0.05$).

$$\text{Prob. de mosquitos vivos o muertos} = \frac{\text{No. de mosquitos mutados}}{\text{No. de mosquitos no mutados}}$$

$$OR = \frac{\text{Probabilidad de mosquitos vivos}}{\text{Probabilidad de mosquitos muertos}}$$

6.5.5. Análisis espacial

6.5.5.1 Distribución de susceptibilidad a piretroides

Para visualizar la distribución espacial de la susceptibilidad a piretroides, utilizamos los porcentajes de mortalidad de 25 poblaciones de *Ae. aegypti* sometidas a bioensayo DD, creamos una base de datos que contenía el nombre de la población, los grados de longitud-latitud y los porcentajes de mortalidad obtenidos, posteriormente creamos un mapa de predicción por cada uno de los insecticidas con el método IDW (Watson y Phillip 1985) el cual asume que cada punto medido tiene una influencia local que disminuye con la distancia. Se les asignó una ponderación mayor a los puntos más cercanos a la posición por predecir, que a aquellos que se encuentran más alejados, de ahí el nombre de distancia inversa ponderada.

Para realizar los mapas de predicción se utilizó el programa R Studio versión 3.6.3, las librerías que se utilizaron fueron *rgdal*, *tmap*, *maptools*, *raster*, *spatstat*, *gstat* y *sp*. Posteriormente los mapas fueron exportados a QGIS versión 3.8.3 donde fueron georreferenciados y se crearon los mapas de salida.

6.5.5.2 Distribución espacial de las frecuencias kdr

Para visualizar la distribución espacial de las frecuencias kdr utilizamos las frecuencias de las mutaciones kdr de las 45 poblaciones de *Ae. aegypti*, creamos una base de datos que contenía el nombre de la población, los grados de longitud-latitud y las frecuencias de cada uno de los 21 genotipos diferentes para las mutaciones V410L, V1016I y F1534C, posteriormente se creó una capa vectorial utilizando el programa QGIS versión 3.8.3, la capa fue georreferenciada con el sistema de referencia de coordenadas WGS84, posteriormente se crearon gráficos de pastel por cada población con los 21 genotipos.

6.5.5.3 Análisis espacial de la resistencia a piretroides y mutaciones kdr

Para visualizar la asociación de la frecuencia de resistencia con los genotipos resultantes de las pruebas moleculares, se conjuntaron la capa de predicción espacial de susceptibilidad creada posteriormente con la capa de los 21 genotipos. Los programas utilizados para crear los mapas fueron R Studio versión 3.6.3 y QGIS versión 3.8.3, permitiendo mapear la distribución de las mutaciones kdr en las zonas de las costas del pacifico y sureste de México, de este modo

se visualizó de manera gráfica la asociación entre la distribución espacial de las frecuencias de las tres mutaciones (V410L, V1016I y F1534C) y la resistencia a piretroides medida como mortalidad menor a 90% en bioensayos con dosis diagnóstico.

Adicionalmente se realizaron análisis de regresión lineal para establecer la relación entre las frecuencias de los genotipos resistentes entre las mutaciones, en los individuos que sobrevivieron a los bioensayos, se calculó el coeficiente de determinación r^2 ($p < 0.05$) para establecer la fuerza de la relación.

7. RESULTADOS

7.1 Bioensayos

La tabla 3 se muestra los resultados de los bioensayos al someter los mosquitos a la dosis diagnóstico de 2 diferentes insecticidas piretroides; permetrina y deltametrina.

En los bioensayos DD con permetrina todas las poblaciones, presentaron un porcentaje de mortalidad menor a 90%, indicando resistencia a piretroides tipo I, a excepción de las poblaciones de Emilio Carranza y Coatzacoalcos con 93 y 91 % respectivamente, el resto de los porcentajes de mortalidad fueron de 0 a 86.54, la mayor frecuencia de resistencia para permetrina se distribuye en la costa sureste del país específicamente en poblaciones de los estados de Veracruz (Cosoleacaque 0% y Cardel 7%) y Tabasco (Villahermosa 3%).

Por otro lado, en los bioensayos con deltametrina, las poblaciones de Rio Bravo, Minatitlán, Acapulco, San Blas, Mazatlán, Sonora y Acuña registraron una mortalidad de entre el 90 y 97 % indicando una posible resistencia, las poblaciones resistentes determinadas por un porcentaje de mortalidad menor al 90% fueron Por otro lado, en los bioensayos con deltametrina, las poblaciones de Rio Bravo, Minatitlán, Acapulco, San Blas, Mazatlán, Sonora y Acuña registraron una mortalidad de entre el 90 y 97 % indicando una posible resistencia, las poblaciones resistentes determinadas por un porcentaje de mortalidad menor al 90% fueron Villahermosa (58%), Emilio Carranza (74%), Poza Rica (76%), Cosoleacaque (75%), Mérida (76%), Vergel (86%), Campeche (84%), Tampico (88%) y Zihuatanejo (85%), en contraste las poblaciones susceptibles indicadas por un porcentaje de mortalidad superior al 97 % fueron José María Morelos (98%), Guasave (98%), La Paz (98%), Monterrey (99%), Cancún (99%), Coatzacoalcos (99%), Muzquiz (99%) y Loreto (100%). Emilio Carranza (74%), Poza Rica (76%), Cosoleacaque (75%), Mérida (76%), Vergel (86%), Campeche (84%), Tampico (88%) y Zihuatanejo (85%), en contraste las poblaciones susceptibles indicadas por un porcentaje de mortalidad superior al 97 % fueron José María Morelos (98%), Guasave (98%), La Paz (98%), Monterrey (99%), Cancún (99%), Coatzacoalcos (99%), Muzquiz (99%) y Loreto (100%). La mayor frecuencia de resistencia para deltametrina se distribuye en la costa sureste del país específicamente en las poblaciones de Villahermosa (58 %), Emilio Carranza (74%) Cosoleacaque (75%), Poza Rica (76 %) y Mérida (76 %).

Tabla 3. Mortalidad de hembras de *Ae. aegypti* después de la exposición a dosis diagnóstico de insecticidas piretroides y estatus en el nivel de resistencia.

Estado	Localidad	% Mortalidad			
		Permetrina	Status	Deltametrina	Status
Coahuila	Muzquiz	75	R ¹	99	S ³
	Acuña	53	R	95	C
Nuevo León	Monterrey	89	R	99	S
Tamaulipas	Tampico	39	R	88	R
	Rio Bravo	76	R	90	C
Veracruz	Cardel	7	R	80	R
	Emilio Carranza	93	C ²	74	R
	Poza Rica	31	R	76	R
	Cosoleacaque	0	R	75	R
	Minatitlán	64	R	96	C
	Coatzacoalcos	91	C	99	S
Tabasco	Villahermosa	3	R	58	R
Yucatán	Mérida	85	R	76	R
	Vergel	87	R	86	R
Quintana Roo	Cancún	65	R	99	S
Guerrero	Acapulco	61	R	94	C
	Zihuatanejo	30	R	85	R
Jalisco	José María Morelos	53	R	98	S
Nayarit	San Blas	59	R	97	C
Sinaloa	Mazatlán	49	R	97	C
	Guasave	37	R	98	S
Sonora	San Luis RC	62	R	96	C
BCS	La Paz	79	R	98	S
	Loreto	87	R	100	S
Belice	Zona Libre	37	R	84	R

¹R resistente, ²C resistencia por confirmar, ³S susceptible

7.2 Frecuencia de mutaciones V410L, V106I, F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti*

En las tablas 4, 5 y 6 se muestran el número de mosquitos de cada genotipo, la frecuencia del alelo mutado y el intervalo de confianza al 95% de las poblaciones de *Ae. aegypti* del este y sur de México incluyendo una población de Belice.

La mayor frecuencia de los genotipos resistentes L410 con base a los resultados de genotipificación se distribuye en las poblaciones de Minatitlán (0.99), Cardel (0.97), Cancún (0.93) y Frontera (0.91), ubicadas en la costa sureste del país.

En el caso de la frecuencia de los genotipos resistentes I1016 se distribuye mayormente en las poblaciones de Cardel (0.95), Minatitlán (0.93) y Heroica Cárdenas (0.88).

Para el alelo resistente C1534 se encuentre fijo en todas las poblaciones analizadas. Con base en los bioensayos y genotipificación realizados, existe una concentración de resistencia en la costa sur del país, específicamente en los estados de Veracruz y Tabasco.

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación V410L en poblaciones de *Ae. aegypti* de la costa del pacífico y sureste de México.

Población	n	LL	VL	VV	Freq. (95% CI)	FIS	x2 Hardy- Weinberg	P value
Guadalupe	30	5	13	12	0.38 (0.23-0.56)	0.08	0.2	>0.05
Mérida	30	9	18	3	0.60 (0.42-0.75)	-0.25	1.87	>0.05
Chiapas	30	4	23	3	0.52 (0.36-0.68)	-0.53	8.58	<0.05
Monterrey	30	12	11	7	0.58 (0.40-0.73)	0.24	1.81	>0.05
San Antonio Kaua	30	15	10	5	0.67 (0.83-1.01)	0.25	1.87	>0.05
Campeche	30	9	14	7	0.53 (0.36-0.69)	0.06	0.11	>0.05
Champotón	30	6	13	11	0.42 (0.26-0.59)	0.1	0.35	>0.05
Cd. del Carmen	30	22	8	0	0.87 (0.69-0.95)	-0.1	0.71	>0.05
Cardel	30	27	3	0	0.95 (0.79-0.99)	-0.05	0.08	>0.05
E. Carranza	27	10	11	6	0.57 (0.38-0.73)	0.16	0.75	>0.05
Poza Rica	29	19	7	3	0.78 (0.59-0.89)	0.3	2.71	>0.05
Cosoleacaque	27	4	13	10	0.39 (0.23-0.57)	-0.01	0.004	>0.05
Minatitlán	30	29	1	0	0.98 (0.83-1.01)	-0.01	0.008	>0.05
Cancún	29	4	13	12	0.36 (0.21-0.54)	0.02	0.02	>0.05
F. Carrillo	30	15	13	2	0.72 (0.53-0.84)	-0.06	0.13	>0.05
Umán	30	12	13	5	0.62 (0.43-0.76)	0.08	0.2	>0.05
Coatzacoalcos	30	13	10	7	0.60 (0.42-0.75)	0.305	4.18	>0.05
Acayucan	30	5	12	13	0.37 (0.21-0.54)	0.138	0.577	>0.05
Frontera	30	4	14	12	0.37 (0.21-0.54)	-0.004	0.0006	<0.05
H Cárdenas	30	24	5	1	0.88 (0.71-0.96)	0.191	1.098	>0.05

Villahermosa	30	15	4	1	0.73 (0.85-0.55)	-0.19	1.119	<0.05
Tampico	29	1	5	23	0.12 (0.03-0.29)	0.187	1.0214	>0.05
Chetumal	25	7	12	6	0.52 (0.33-0.69)	0.038	0.036	>0.05
Mérida	30	8	19	3	0.58 (0.40-0.73)	-0.3	2.751	<0.05
Vergel	30	10	19	1	0.65 (0.47-0.79)	-0.39	4.608	<0.05
Valladolid	30	12	15	3	0.65 (0.47-0.79)	-0.09	0.293	<0.05
Belice	30	5	18	7	0.47 (0.30-0.63)	-0.2	1.26	<0.05
Acapulco	30	23	7	0	0.88 (0.71-0.96)	-0.13	0.52	>0.05
Coyuca	30	21	8	1	0.83 (0.65-0.93)	0.04	0.05	>0.05
Zihuatanejo	30	19	11	0	0.81 (0.64-0.91)	-0.22	1.51	>0.05
Tecomán	30	7	15	8	0.48 (0.31-0.65)	0.00	0.00004	>0.05
Manzanillo	30	4	22	2	0.50 (0.35-0.70)	-0.69	10.21	<0.05
Colima	30	24	6	0	0.90 (0.73-0.97)	-0.11	0.37	>0.05
José Ma. Morelos	30	1	20	9	0.36 (0.21-0.30.54)	-0.44	5.69	<0.05
Puerto Vallarta	30	9	8	13	0.43 (0.27-0.60)	0.46	6.27	<0.05
Compostela	30	16	14	0	0.76 (0.58-0.88)	-0.30	2.78	>0.05
San Blas	30	2	18	10	0.36 (0.21-0.54)	-0.29	2.56	>0.05
Villa Unión	30	7	14	9	0.46 (0.30-0.63)	0.06	0.12	>0.05
Guasave	30	19	11	0	0.81 (0.64-0.91)	-0.22	1.51	>0.05
La Paz	30	8	13	9	0.48 (0.31-0.65)	0.13	0.53	>0.05
Constitución	30	11	16	3	0.63 (0.45-0.78)	-0.15	0.66	>0.05
Loreto	30	5	16	9	0.43 (0.27-0.60)	-0.09	0.22	>0.05
SLRC, Sonora	30	7	21	2	0.58 (0.40-0.73)	-0.44	5.81	<0.05
Honduras	30	6	17	7	0.48 (0.31-0.65)	-0.13	0.54	>0.05
Piedras Negras	30	7	12	11	0.43 (0.27-0.60)	0.19	1.03	>0.05
Acuña	30	2	22	6	0.43 (0.27-0.60)	-0.49	7.30	<0.05
Muzquiz	30	20	9	1	0.81 (0.64-0.91)	0.00	0.0001	>0.05

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti* de la costa del pacífico y sureste de México.

Población	n	II	VI	VV	Freq. (95% CI)	FIS	x2 Hardy- Weinberg	P value
Guadalupe	30	10	20	0	0.67 (0.48-0.80)	-0.5	7.5	<0.05
Mérida	30	10	17	3	0.62 (0.43-0.76)	-0.19	1.18	<0.05
Chiapas	30	3	26	1	0.53 (0.36-0.69)	-0.74	16.4	>0.05
Monterrey	30	5	17	8	0.45 (0.28-0.62)	-0.14	0.62	>0.05
San Antonio Kaua	30	16	12	2	0.73 (0.83-1.01)	-0.02	0.01	>0.05
Campeche	30	12	15	3	0.65 (0.47-0.79)	-0.09	0.29	>0.05
Chamotón	30	5	14	11	0.40 (0.24-0.57)	0.02	0.02	>0.05
Cd. del Carmen	30	22	6	2	0.83 (0.65-0.93)	0.28	2.35	>0.05

Cardel	30	27	3	0	0.95 (0.79-0.99)	-0.05	0.08	<0.05
E. Carranza	27	0	20	7	0.37 (0.21-0.55)	-0.58	9.34	<0.05
Poza Rica	29	2	7	20	0.19 (0.08-0.37)	0.21	1.33	>0.05
Cosoleacaque	27	6	20	1	0.59 (0.40-0.75)	-0.53	7.7	>0.05
Minatitlán	30	27	2	1	0.93 (0.77-0.99)	0.46	6.46	>0.05
Cancún	29	17	12	0	0.79 (0.61-0.90)	-0.26	1.97	>0.05
F. Carrillo	30	15	13	2	0.72 (0.53-0.80)	-0.06	0.13	>0.05
Umán	30	9	17	4	0.58 (0.40-0.73)	-0.16	0.82	>0.05
Coatzacoalcos	30	10	18	2	0.63(0.45-0.78)	-0.29	2.55	>0.05
Acayucan	30	6	13	11	0.42 (0.26-0.59)	0.108	0.35	>0.05
Frontera	30	5	25	0	0.58 (0.40-0.73)	-0.71	15.3	<0.05
H Cárdenas	30	24	5	1	0.88 (0.71-0.96)	0.191	1.09	>0.05
Villahermosa	30	14	15	1	0.72 (0.53-0.84)	-0.231	1.6	>0.05
Tampico	29	15	10	4	0.69 (0.50-0.82)	0.19	1.09	>0.05
Chetumal	25	6	13	6	0.50 (0.48-0.80)	-0.04	0.04	>0.05
Mérida	30	9	18	3	0.60 (0.42-0.75)	-0.25	1.87	>0.05
Vergel	30	9	20	1	0.63 (0.45-0.78)	-0.43	5.68	>0.05
Valladolid	30	12	15	3	0.65 (0.47-0.79)	-0.09	0.29	>0.05
Belice	30	24	5	1	0.88 (0.71-0.96)	0.19	1.09	>0.05
Acapulco	30	23	7	0	0.88 (0.71-0.91)	-0.13	0.52	>0.05
Coyuca	30	4	26	0	0.56 (0.39-0.75)	-0.76	17.54	<0.05
Zihuatanejo	30	20	10	0	0.83 (0.65-0.93)	-0.20	1.20	>0.05
Tecomán	30	2	28	0	0.53 (0.36-0.69)	-0.88	22.97	<0.05
Manzanillo	30	7	21	2	0.58 (0.40-0.73)	-0.44	5.81	<0.05
Colima	30	15	15	0	0.75 (0.56-0.87)	-0.33	3.33	>0.05
José Ma. Morelos	30	0	30	0	0.50 (0.33-0.66)	-1.00	30.00	<0.05
Puerto Vallarta	30	0	30	0	0.50 (0.33-0.66)	-1.00	30.00	<0.05
Compostela	30	11	19	0	0.68 (0.34-0.68)	-0.46	6.44	<0.05
San Blas	30	1	29	0	0.51 (0.67-0.94)	-0.94	26.25	<0.05
Villa Unión	30	21	9	0	0.85 (0.62-0.90)	-0.18	0.93	>0.05
Guasave	30	18	12	0	0.80 (0.30-0.63)	-0.25	1.88	>0.05
La Paz	30	4	20	6	0.46 (0.33-0.66)	-0.34	3.45	>0.05
Constitución	30	0	30	0	0.50 (0.33-0.66)	-1.00	30.00	<0.05
Loreto	30	5	20	5	0.50 (0.33-0.66)	-0.33	3.33	>0.05
SLRC, Sonora	30	14	16	0	0.73 (0.55-0.85)	-0.36	3.97	<0.05
Honduras	30	1	28	1	0.50 (0.33-0.66)	-0.87	22.53	<0.05
Piedras Negras	30	20	9	1	0.81 (0.64-0.91)	0.00	0.00	>0.05
Acuña	30	9	14	7	0.53 (0.36-0.69)	0.06	0.12	>0.05
Muzquiz	30	8	13	9	0.48 (0.31-0.65)	0.13	0.53	>0.05

Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti* de la costa del pacífico y sureste de México.

Población	n	CC	FC	FF	Freq. (95% CI)	FIS	x2 Hardy- Weinberg	P value
Guadalupe	30	29	1	0	0.98 (0.83-1.01)	-0.01	0.008	>0.05
Mérida	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	----	----	----
Chiapas	30	24	6	0	0.90 (0.73-0.97)	-0.11	0.37	>0.05
Monterrey	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	----	----	----
San Antonio Kaua	30	30	0	0	1.0 (0.83-1.01)	----	----	----
Campeche	30	28	2	0	0.97 (0.81-1.01)	-0.03	0.03	>0.05
Champotón	30	29	1	0	0.98 (0.83-1.01)	-0.01	0.01	>0.05
Cd. del Carmen	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	----	----	----
Cardel	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	----	----	----
E. Carranza	27	27	0	0	1.0 (0.84-1.02)	----	----	----
Poza Rica	29	29	0	0	1.0 (0.85-1.02)	----	----	----
Cosoleacaque	27	17	10	0	0.81 (0.62-0.92)	-0.22	1.39	>0.05
Minatitlán	30	18	11	1	0.78 (0.60-0.89)	-0.08	0.19	>0.05
Cancún	29	27	2	0	0.97 (0.81-1.0)	-0.03	0.03	>0.05
F. Carrillo	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.029)	----	----	----
Umán	30	27	3	0	0.95 (0.79-0.99)	-0.05	0.08	>0.05
Coatzacoalcos	30	28	2	0	0.95 (0.76-1.00)	-0.04	0.03	>0.05
Acayucan	30	25	5	0	0.91(0.75-0.98)	-0.09	0.24	>0.05
Frontera	30	29	1	0	0.98 (0.83-1.01)	-0.01	0.008	>0.05
H Cárdenas	30	7	22	1	0.60 (0.42-0.75)	-0.52	8.35	>0.05
Villahermosa	30	30	0	0	1.0 (0.85-1.02)	---	---	---
Tampico	29	29	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Chetumal	25	24	1	0	0.98 (0.81-1.01)	-0.02	0.01	>0.05
Mérida	30	25	4	1	0.90 (0.73-0.97)	0.25	2.01	>0.05
Vergel	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Valladolid	30	16	14	0	0.77 (0.58-0.88)	-0.3	2.77	>0.05
Belice	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Acapulco	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Coyuca	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Zihuatanejo	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Tecomán	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Manzanillo	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Colima	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
José Ma. Morelos	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Puerto Vallarta	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Compostela	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
San Blas	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Villa Unión	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---

Guasave	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
La Paz	30	21	9	0	0.85 (0.67-0.94)	-0.18	0.934256055	>0.05
Constitución	30	29	1	0	0.98 (0.83-1.01)	-0.02	0.008618213	>0.05
Loreto	30	17	13	0	0.78 (0.60-0.89)	-0.28	2.295156179	>0.05
SLRC, Sonora	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Honduras	30	30	0	0	1.0 (0.86-1.02)	---	---	---
Piedras Negras	30	22	7	1	0.85 (0.67-0.94)	0.08	0.216583365	>0.05
Acuña	30	25	4	1	0.90 (0.73-0.97)	0.26	2.016460905	>0.05
Muzquiz	30	13	16	1	0.70 (0.51-0.83)	-0.27	2.184429327	>0.05

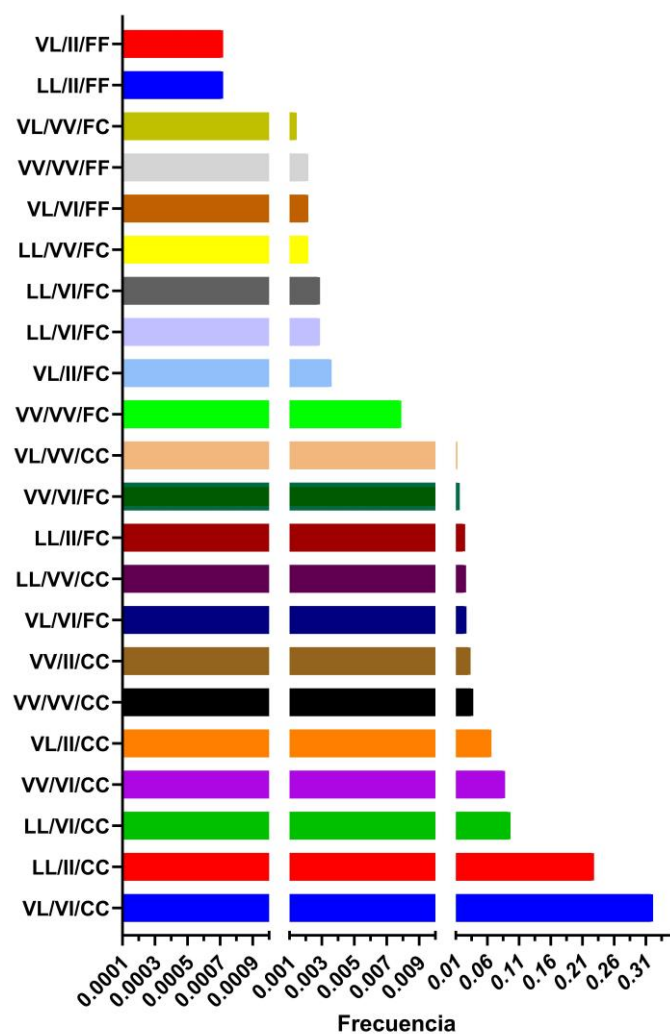


Figura 5. Frecuencias obtenidas de los genotipos para las 3 mutaciones en 45 poblaciones de *Ae. aegypti*

Se obtuvieron las frecuencias totales de 45 poblaciones de *Ae. aegypti* (Figura 5) en las cuales se encontraron 21 genotipos diferentes de los 27 posibles considerando las 3 mutaciones (V410L, V1016I y F1534C), el genotipo más común fue el doble heterocigoto para 410 y 1016 y homocigoto resistente para 1534 (VL/VI/CC) con una frecuencia de 0.32, seguido del triple homocigoto resistente (LL/II/CC) con 0.22. El resto de los genotipos presentaron frecuencias por debajo de 0.1 de los cuales nueve (VV/VV/FC, LL/VI/FC, VL/II/FC, LL/VV/FC, VL/VI/FF, VV/VV/FF, VL/VV/FC, LL/II/FF y VL/II/FF) fueron menores a 0.001.

7.3 Asociación Genotipo- Fenotipo

Se realizó un análisis de comparación de momios (Tabla 7) utilizando 10 poblaciones las cuales fueron sometidas a bioensayo y se genotificaron los individuos vivos y muertos por separado, posteriormente se hizo el análisis de momios con la prueba exacta de Fisher ($p < 0.05$) y encontramos asociación de la resistencia a permetrina con los genotipos resistentes en los individuos que sobrevivieron al bioensayo en la mayoría de las poblaciones.

La asociación fue significativa en las poblaciones de los estados de Nayarit, Mazatlán y La Paz en el primer caso (LL/II/CC vs VV/VV/CC), en el segundo (LL/II/CC vs VL/VI/CC) la población del estado de Acapulco y en el último (LL/II/CC vs VL/II/CC) la población del estado de Nayarit.

Tabla 7. Asociación de genotipos kdr con la respuesta a bioensayo DD con permetrina

Población	N	Fenotipo	LL/II/CC	VV/VV/CC		OR	P value	LL/II/CC	VL/VI/CC	OR	P value	LL/II/CC	VL/II/CC	OR	P value
Acapulco	58	Vivo	34	3		4.1212	0.0956	34	17	3.0909	0.0172	34	2	0	0.5827
	37	Muerto	11	4				11	17			11	0		
Zihuatanejo	66	Vivo	8	2		8	0.2027	8	8	2	0.5417	8	16	-	-
	28	Muerto	1	2				1	2			1	0		
Morelos	41	Vivo	4	9		1.2778	0.5037	4	10	0.55	0.3348	4	2	0.5	0.489
	47	Muerto	8	23				8	11			8	2		
Nayarit	43	Vivo	33	4		8.8	0.00026	33	2	2.2	0.3956	33	2	20.9	0.0000042
	57	Muerto	15	16				15	2			15	19		
Mazatlán	50	Vivo	20	3		4.44	0.0364	20	3	1.33	0.5415	20	7	1.9048	0.2163
	50	Muerto	15	10				15	3			15	10		
Guasave	63	Vivo	59	0		-	-	59	0	-	-	59	3	3.93	0.1237
	37	Muerto	15	2				15	14			15	3		
La Paz	28	Vivo	26	2		14.8571	0.00012	26	0	-	-	26	0	-	-
	72	Muerto	15	16				15	2			15	9		
Loreto	0	Vivo	10	0		-	-	10	0	-	-	10	0	-	-

	99	Muerto	42	25				42	1			42	2		
San Luis RC	39	Vivo	31	0		-	-	31	0	-	-	31	8	20.925	5.85
	61	Muerto	5	9				5	16			5	27		
Monterrey	11	Vivo	6	0		-	-	6	1	1.7368	0.5304	6	3	0.3158	0.1687
	85	Muerto	38	9				38	11			38	6		

Un total de 10 poblaciones de *Ae. aegypti* expuestas a DD de los dos insecticidas piretroides fueron genotipadas y todas exhibieron las mutaciones V410L, V106I y F1534C. Los mosquitos de fenotipo vivo para cada insecticida en cada población se asociaron con el genotipo resistente homocigoto con respecto al homocigoto susceptible para cada mutación. La frecuencia del genotipo L410/L410 resistente estuvo significativamente asociado con la resistencia a permetrina en la población de Morelos (OR= 0.0445, P = 0.0445), Nayarit (OR=12.25; P= 0.000009) y Guasave (OR=15.73; P=0.0108) (Tabla 8).

Para el caso de la mutación V106I, el genotipo resistente I1016/I1016 se asoció significativamente con la resistencia a la permetrina en las poblaciones de Zihuatanejo (OR=68.75; P=0.00005), Nayarit (OR= 3.7838; P= 0.01879) y La Paz (OR=8.6667; P=0.0009) (Tabla 9).

Para la mutación F1534C los resultados de OR fueron infinitos debido a la ausencia de haplotipos F1534/F1534 y F1534/C1534. Prácticamente esta mutación se encontró fija en todas las poblaciones analizadas (Tabla 10).

Por otro lado, no se encontró asociación de los genotipos resistentes para L410/L410, I1016/I1016 ni C1534/C1534 con la resistencia a deltametrina.

Tabla 8. Asociación de genotipo resistente para V410L con la resistencia a piretroides

Población	410													
	Permetrina							Deltametrina						
	n	Fenotipo	LL	LV	VV	OR	P value	n	Fenotipo	LL	VL	VV	OR	P value
Acapulco	58	Vivo	19	39	3	2.303	0.28	6	Vivo	6	0	0	-	-
	37	Muerto	11	22	4			94	Muerto	36	43	15		
Zihuatanejo	66	Vivo	39	24	3	1.1818	0.6	15	Vivo	14	1	0	-	-
	28	Muerto	22	4	2			81	Muerto	22	45	14		
Morelos	41	Vivo	20	12	9	6.1728	0.0008	2	Vivo	2	0	0	-	-

	47	Muerto	9	13	25			97	Muerto	53	13	31		
Nayarit	43	Vivo	35	4	4	12.25	0.000009	3	Vivo	3	0	0	-	-
	57	Muerto	15	21	21			96	Muerto	52	5	39		
Mazatlán	50	Vivo	24	19	7	2.6122	0.061	3	Vivo	3	0	0	-	-
	50	Muerto	21	13	16			97	Muerto	59	22	16		
Guasave	63	Vivo	59	3	1	15.7333	0.0108	2	Vivo	2	0	0	-	-
	37	Muerto	15	18	4			98	Muerto	53	39	6		
La Paz	28	Vivo	26	0	2	24.1429	1.4634	2	Vivo	2	0	0	-	-
	72	Muerto	21	12	39			98	Muerto	69	8	21		
Loreto	0	Vivo	0	0	0	-	-	0	Vivo	0	0	0	-	-
	99	Muerto	68	0	31			99	Muerto	68	0	31		
San Luis RC	39	Vivo	31	8	0	-	-	6	Vivo	6	0	0	-	-
	61	Muerto	5	45	11			76	Muerto	28	34	14		
Monterrey	11	Vivo	7	4	0	-	-	1	Vivo	1	0	0	-	-
	85	Muerto	58	17	10			98	Muerto	65	21	12		

Tabla 9. Asociación de genotipo resistente para V1016F con la resistencia a piretroides

Población	1016													
	Permetrina							Deltametrina						
	n	Fenotipo	II	VI	VV	OR	P value	n	Fenotipo	II	VI	VV	OR	P value
Acapulco	58	Vivo	19	36	3	2.8788	0.1807	6	Vivo	6	0	0	-	-
	37	Muerto	11	21	5			94	Muerto	36	49	9		
Zihuatanejo	66	Vivo	55	9	2	68.75	0.00005	15	Vivo	14	1	0	-	-
	28	Muerto	2	21	5			81	Muerto	27	48	6		
Morelos	41	Vivo	6	26	9	1.5333	0.3662	2	Vivo	2	0	0	-	-
	47	Muerto	10	14	23			97	Muerto	26	40	31		
Nayarit	43	Vivo	35	4	4	3.7838	0.01879	3	Vivo	3	0	0	-	-
	57	Muerto	37	4	16			96	Muerto	29	28	39		
Mazatlán	50	Vivo	30	8	12	1.4	0.32	3	Vivo	3	0	0	-	-
	50	Muerto	25	11	14			97	Muerto	65	20	12		
Guasave	63	Vivo	63	0	0	-	-	2	Vivo	2	0	0	-	-
	37	Muerto	19	15	3			98	Muerto	53	38	7		
La Paz	28	Vivo	26	0	2	8.6667	0.0009	2	Vivo	2	0	0	-	-
	72	Muerto	39	7	26			98	Muerto	72	12	14		
Loreto	0	Vivo	0	0	0	-	-	0	Vivo	0	0	0	-	-
	99	Muerto	47	21	31			99	Muerto	47	21	31		
San Luis RC	39	Vivo	39	0	0	-	-	6	Vivo	6	0	0	-	-
	61	Muerto	33	17	11			76	Muerto	37	27	12		
Monterrey	11	Vivo	9	2	0	-	-	1	Vivo	1	0	0	-	-
	85	Muerto	44	31	10			98	Muerto	43	44	11		

Tabla 10. Asociación de genotipo resistente para F1534C con la resistencia a piretroides

Población	1534													
	Permetrina							Deltametrina						
	n	Fenotipo	CC	FC	FF	OR	P value	n	Fenotipo	CC	FC	FF	OR	P value
Acapulco	58	Vivo	58	0	0	-	-	6	Vivo	6	0	0	-	-
	37	Muerto	33	4	0			94	Muerto	70	24	0		
Zihuatanejo	66	Vivo	66	0	0	-	-	15	Vivo	15	0	0	-	-
	28	Muerto	22	6	0			81	Muerto	81	0	0		
Morelos	41	Vivo	41	0	0	-	-	2	Vivo	2	0	0	-	-
	47	Muerto	47	0	0			97	Muerto	85	12	0		
Nayarit	43	Vivo	43	0	0	-	-	3	Vivo	3	0	0	-	-
	57	Muerto	57	0	0			96	Muerto	29	0	0		
Mazatlán	50	Vivo	50	0	0	-	-	3	Vivo	3	0	0	-	-
	50	Muerto	45	5	0			97	Muerto	97	0	0		
Guasave	63	Vivo	63	0	0	-	-	2	Vivo	2	0	0	-	-
	37	Muerto	37	0	0			98	Muerto	98	0	0		
La Paz	28	Vivo	28	0	0	-	-	2	Vivo	2	0	0	-	-
	72	Muerto	61	1	2			98	Muerto	97	0	1		
Loreto	0	Vivo	0	0	0	-	-	0	Vivo	0	0	0	-	-
	99	Muerto	99	0	0			99	Muerto	99	0	0		
San Luis RC	39	Vivo	39	0	0	-	-	6	Vivo	6	0	0	-	-
	61	Muerto	61	0	0			76	Muerto	76	0	0		
Monterrey	11	Vivo	11	0	0	-	-	1	Vivo	1	0	0	-	-
	85	Muerto	85	0	0			98	Muerto	98	0	0		

En las poblaciones genotipificadas con previa exposición a DD de permetrina registramos un total de siete haplotipos: V-V-F, V-V-C, V-I-F, V-I-C, L-V-C, L-I-F y L-I-C (Tabla 11). En cuanto a la variedad de genotipos conjuntando las tres mutaciones asociadas a la respuesta a DD con permetrina se encontraron 17 genotipos distintos en el grupo muertos, de los cuales 8 estuvieron presentes en el grupo vivos. Para ambos grupos el genotipo LL/II/CC resulto el más común, con una frecuencia de 0.60 en el grupo vivos y 0.29 en el grupo muertos.

Los genotipos con frecuencias mayores a 0.1 fueron: VV/VV/CC (0.20 muertos), VL/VI/CC (0.14 muertos; 0.10 vivos), VL/II/CC (0.13 muertos; 0.11 vivos), 13 genotipos del grupo muertos presentaron frecuencias menores al 0.1. Por otro lado 5 genotipos (VV/VV/CC, LL/VI/CC, VV/II/CC VV/VI/CC y VL/VV/CC) del grupo vivos presentaron frecuencias menores al 0.1(Figura 6).

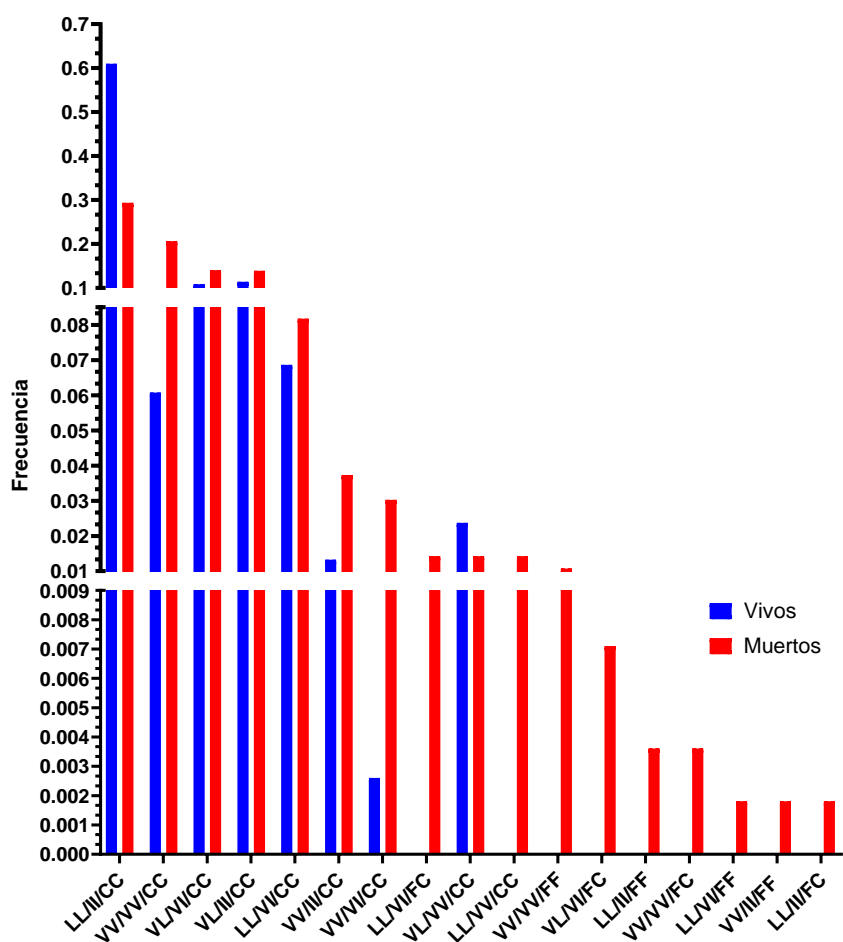


Figura 6. Genotipos de 10 poblaciones de *Ae. aegypti* asociados a respuesta DD con permetrina

Tabla 11. Haplotipos encontrados en poblaciones de *Ae. aegypti* expuestos a DD permetrina

Permetrina							
Genotipo	Muertos	Vivos	Total	Haplotipo	Muertos	Vivos	Total
VV VV FF	6	0	6	V-V-F	6	0	6
VV VV FC	2	0	2	V-V-C	118	23	141
VV VV CC	116	23	139				

VV VI FF	0	0	0	V-I-F	1	0	1
VV II FF	1	0	1				
VV VI FC	0	0	0	V-I-C	38	6	44
VV VI CC	17	1	18				
VV II FC	0	0	0				
VV II CC	21	5	26				
VL VV FF	0	0	0	L-V-F	-	-	-
LL VV FF	0	0	0				
VL VV FC	0	0	0	L-V-C	16	9	25
VL VV CC	8	9	17				
LL VV FC	0	0	0				
LL VV CC	8	0	8				
VL VI FF	0	0	0	L-I-F	3	0	3
VL II FF	0	0	0				
LL VI FF	1	0	1				
LL II FF	2	0	2				
VL VI FC	4	0	4	L-I-C	351	341	722
VL VI CC	79	41	120				
VL II FC	0	0	0				
VL II CC	78	43	121				
LL VI FC	8	0	8				
LL VI CC	46	26	72				
LL II FC	1	0	1				
LL II CC	135	231	396				

En el caso de deltametrina registramos cinco haplotipos: V-V-F, V-V-C, V-I-C, L-V-C y L-I-C (Tabla 12), el 100% de los sobrevivientes presentaron el genotipo triple homocigoto resistente (LL/II/CC), en el caso de los individuos muertos se encontraron 16 genotipos distintos. El genotipo más común fue el triple homocigoto resistente LL/II/CC con una frecuencia de 0.39, seguido de VL/VI/CC (0.17), VV/VV/CC (0.15) y LL/VI/CC (0.12). 12 genotipos presentaron frecuencias menores a 0.1 de los cuales 7 fueron menores a 0.01 (Figura 7).

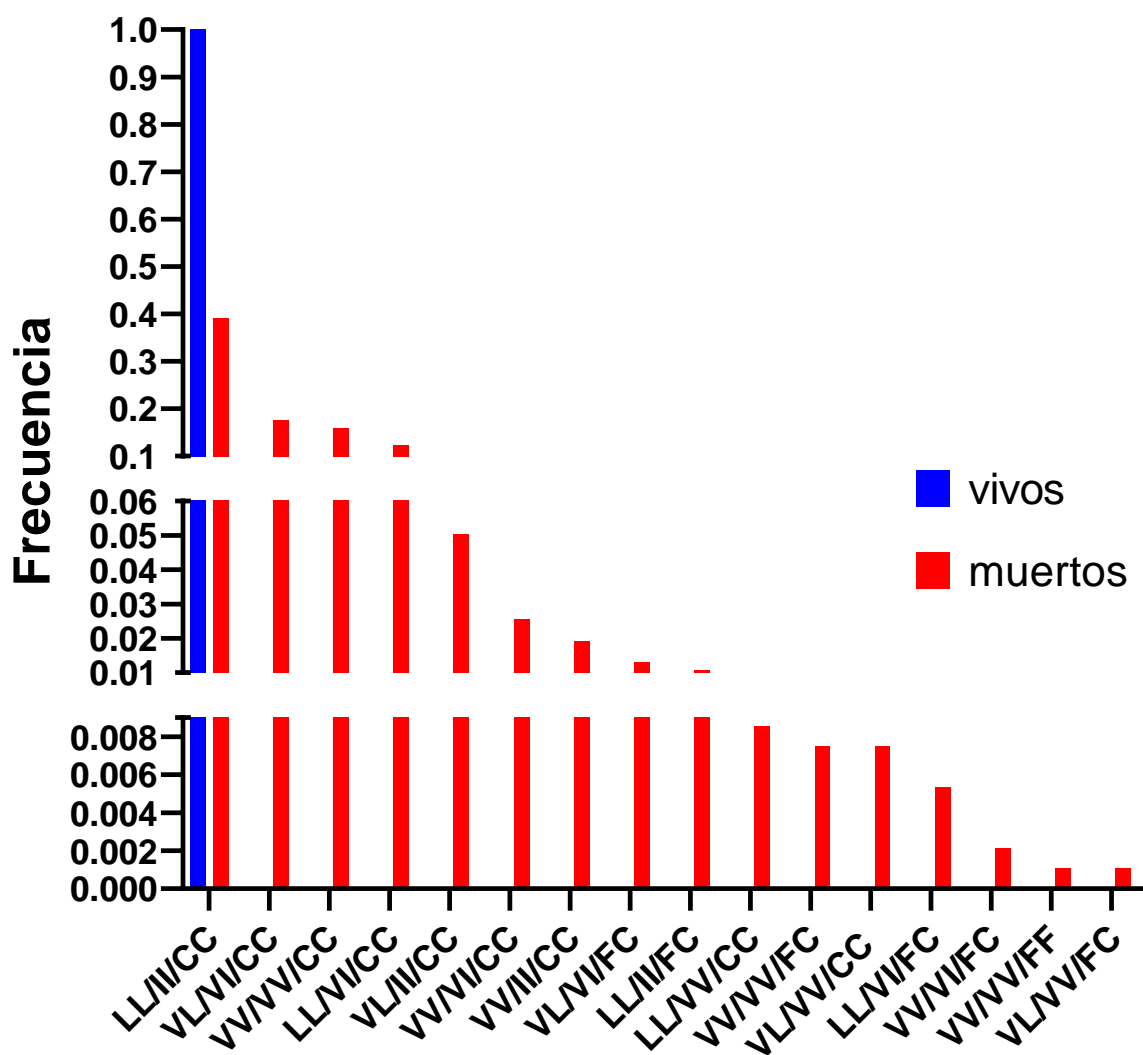


Figura 7. Genotipos de 10 poblaciones de *Ae. aegypti* asociados a respuesta DD con deltametrina

Tabla 12. Haplotipos encontrados en poblaciones de *Ae. aegypti* expuestos a DD deltametrina

Deltametrina							
Genotipo	Muertos	Vivos	Total	Haplotipo	Muertos	Vivos	Total
VV VV FF	1	0	1	V-V-F	1	0	1
VV VV FC	7	0	7	V-V-C	155	0	155
VV VV CC	148	0	148				
VV VI FF	0	0	0	V-I-F	-	-	-
VV II FF	0	0	0				
VV VI FC	2	0	2	V-I-C	44	0	44

VV VI CC	24	0	24				
VV II FC	0	0	0				
VV II CC	18	0	18				
VL VV FF	0	0	0	L-V-F	-	-	-
LL VV FF	0	0	0				
VL VV FC	1	0	1	L-V-C	16	0	16
VL VV CC	7	0	7				
LL VV FC	0	0	0				
LL VV CC	8	0	8	L-I-F	-	-	-
VL VI FF	0	0	0				
VL II FF	0	0	0				
LL VI FF	0	0	0				
LL II FF	0	0	0	L-I-C	718	40	758
VL VI FC	12	0	12				
VL VI CC	163	0	163				
VL II FC	0	0	0				
VL II CC	47	0	47				
LL VI FC	5	0	5				
LL VI CC	115	0	115				
LL II FC	10	0	10				
LL II CC	366	40	406				

El haplotipo triple homocigoto mutante (CC/II/LL) se presentó en un 100% en los individuos sobrevivientes a los bioensayos DD con deltametrina, mientras que para los individuos muertos fue en un rango de 22 a 68 % (Tabla 13). En el caso de los ensayos DD con permetrina no se observó una relación aparente entre el haplotipo CC/VV/LL y los individuos vivos (9 – 100%) y muertos (3.5 - 46.6%), debido al amplio porcentaje de aparición entre las poblaciones (Tabla 14).

Tabla 13. Co-ocurrencia de genotipos para las mutaciones V410L, V1016I y F1534C relacionada con la respuesta a bioensayos DD con deltametrina en 10 poblaciones de *Ae. aegypti*.

Haplotipos	Acapulco		Zihuatanejo		JJ Morelos		Nayarit		Mazatlán		Guasave		La Paz		Loreto		San Luis RC		Monterrey	
Respuesta DD	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M
n	6	94	15	81	2	97	3	96	3	97	2	98	2	98	0	99	6	76	1	98
VV/VV/FF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
VV/VV/FC	0	3	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VL/VV/FC	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VV/VI/FC	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VL/VI/FC	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LL/VI/FC	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LL/II/FC	0	8	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VV/VV/CC	0	6	0	6	0	26	0	37	0	11	0	5	0	11	0	30	0	12	0	4
VL/VV/CC	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3
LL/VV/CC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	4
VV/VI/CC	0	4	0	5	0	1	0	2	0	3	0	0	0	4	0	1	0	0	0	4
VL/VI/CC	0	31	0	41	0	9	0	0	0	4	0	32	0	7	0	2	0	25	0	12
LL/VI/CC	0	1	0	2	0	24	0	26	0	7	0	6	0	1	0	18	0	2	0	28
VV/II/CC	0	1	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1	0	5	0	0	0	2	0	4
VL/II/CC	0	0	0	4	0	2	0	3	0	11	0	6	0	0	0	6	0	9	0	6
LL/II/CC	6	27	15	20	2	22	3	26	3	58	2	46	2	67	0	41	6	26	1	33

n: número de individuos; V: vivos, M: muertos

Tabla 14. Co-ocurrencia de genotipos para las mutaciones V410L, V1016I y F1534C relacionada con la respuesta a bioensayos DD con permetrina en 10 poblaciones de *Ae. aegypti*.

	Acapulco		Zihuatanejo		JJ Morelos		Nayarit		Mazatlán		Guasave		La Paz		Loreto		San Luis RC		Monterrey	
Respuesta DD	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M
n	58	37	36	28	41	47	43	57	50	50	63	37	28	71	10	90	39	61	11	85
VV/VV/FF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
LL/VI/FF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
VV/II/FF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
LL/II/FF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
VV/VV/FC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VL/VI/FC	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LL/VI/FC	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LL/II/FC	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VV/VV/CC	3	4	2	2	9	23	4	16	3	10	0	2	2	16	0	25	0	9	0	9
VL/VV/CC	0	1	0	2	0	0	0	0	9	0	0	1	0	1	0	1	0	2	0	0
LL/VV/CC	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	2	0	0	0	1
VV/VI/CC	0	0	0	0	0	2	0	2	1	4	0	1	0	3	0	3	0	1	0	1
VL/VI/CC	17	17	8	2	10	11	2	2	3	3	0	14	0	2	0	1	0	16	1	11
LL/VI/CC	2	0	1	14	16	1	2	0	4	1	0	0	0	1	0	10	0	0	1	19
VV/II/CC	0	0	1	0	0	0	0	3	3	0	1	1	0	12	0	4	0	1	0	0
VL/II/CC	2	0	16	0	2	2	19	7	10	3	3	0	9	0	2	8	27	3	6	6
LL/II/CC	34	11	8	1	4	8	33	15	20	15	59	15	26	15	10	42	31	5	6	38

n: número de individuos; V: vivos, M: muertos

7.4 Distribución de la susceptibilidad a piretroides

En la figura 8 se muestra un análisis espacial para ver de manera gráfica y localizada las zonas con mayor y menor susceptibilidad, con base en la mortalidad a DD de permetrina (Figura 8A) podemos observar cómo las poblaciones más susceptibles se encuentran localizadas al norte del país y las poblaciones menos susceptibles al centro y sur del país, sin embargo de acuerdo al criterio de la OMS 2016 que establece que las poblaciones con mortalidad menor al 90% se consideran resistentes, por lo que los focos de mayor resistencia se encuentran en los estados de Veracruz y Tabasco y en las poblaciones de Guasave, Sinaloa y Zihuatanejo, Guerrero con porcentajes de mortalidad menores al 30 %.

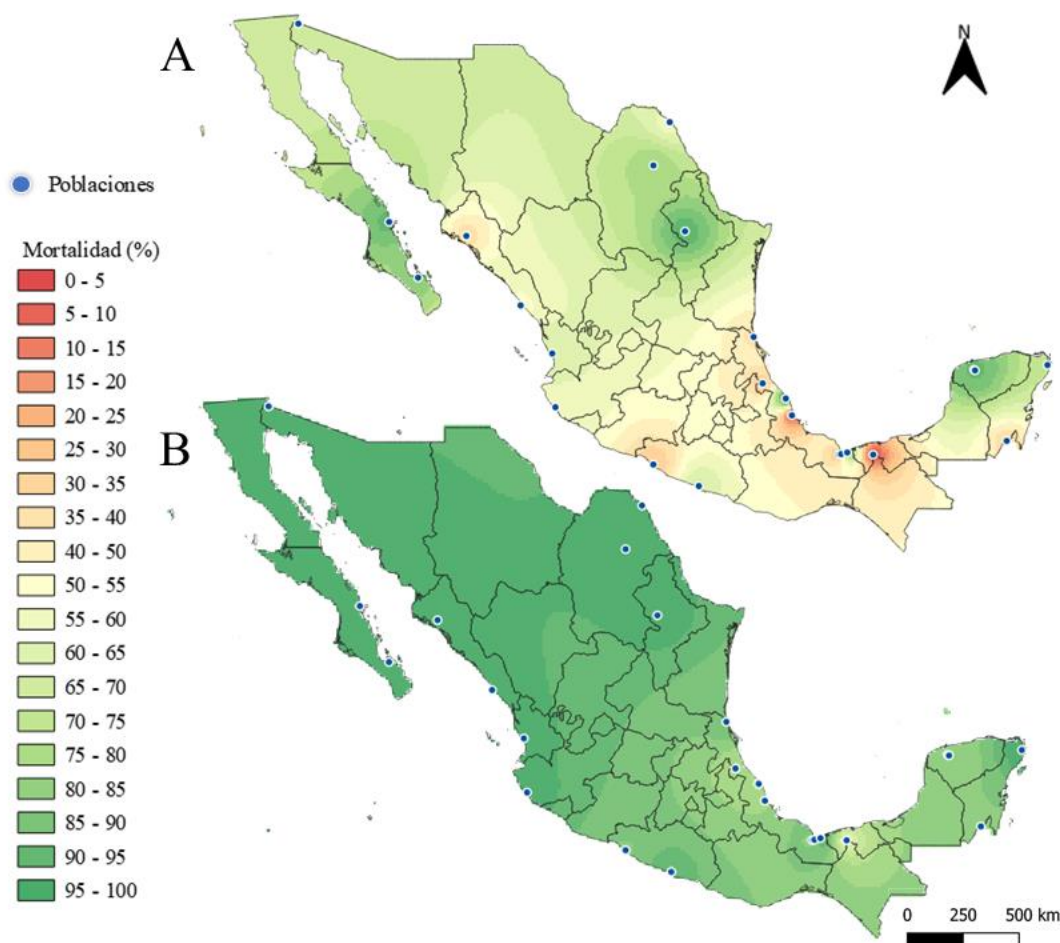


Figura 8. Análisis espacial de susceptibilidad **A.** permetrina. **B.** deltametrina.

En el caso de deltametrina (Figura 8B), al igual que para permetrina las poblaciones más susceptibles a este insecticida también se ubican al norte del país y las menos susceptibles al sur del país, sin embargo, de acuerdo con el criterio de resistencia de la OMS los focos de mayor resistencia se encuentran en los estados de Tabasco y Veracruz, sin embargo, la frecuencia de resistencia en comparación con la permetrina es considerablemente menor.

Sabemos que la presión ejercida por los insecticidas en los últimos años ha favorecido mayormente a la resistencia a piretroides tipo 1, lo cual se hace visible si comparamos el panorama de mortalidad entre permetrina y deltametrina.

7.5 Distribución espacial de las frecuencias kdr

En la figura 9 se muestra de manera gráfica la distribución de los genotipos, para el genotipo más común VL/VI/CC las frecuencias más altas estuvieron en las poblaciones de José María Morelos, Jalisco con 66%, San Blas, Nayarit con 56%, Mérida, Yucatán y Cd. Constitución, Baja California Sur (53%). En el caso del triple homocigoto resistente (LL/II/CC), las poblaciones con las frecuencias más altas fueron: Cardel con 86% seguido de Cd, del Carmen, Campeche con 63%, Felipe Carrillo, Tabasco con 60%, Minatitlán, Veracruz con 58%, Guasave, Sinaloa con 56% y Zihuatanejo, Guerrero con 53%.

Las poblaciones con mayor variabilidad genotípica fueron Muzquiz, Acuña y Piedras Negras del estado de Coahuila con 11, 10 y 9 genotipos diferentes respectivamente, así también Loreto, Baja California Sur con 9 y Acayucan, Veracruz con 10 genotipos distintos.

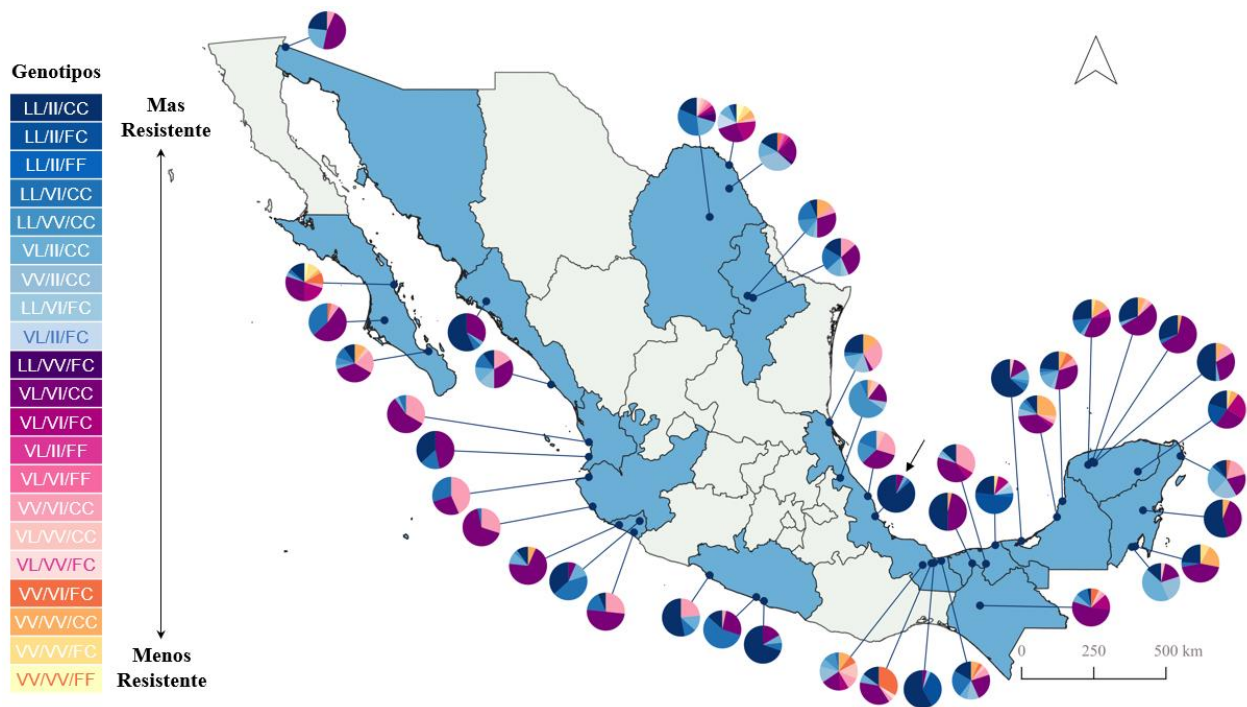


Figura 9 Frecuencias de genotipos kdr en 45 poblaciones de *Ae. aegypti* de México

7.6 Análisis espacial de la resistencia a piretroides y mutaciones kdr

Comparamos los resultados de mortalidad con los genotipos obtenidos inicialmente y podemos ver (Figura 10) cómo para el caso de permetrina las mayores frecuencias del genotipo LL/II/CC coinciden con las zonas de mayor frecuencia de resistencia obtenidas en los bioensayos DD.

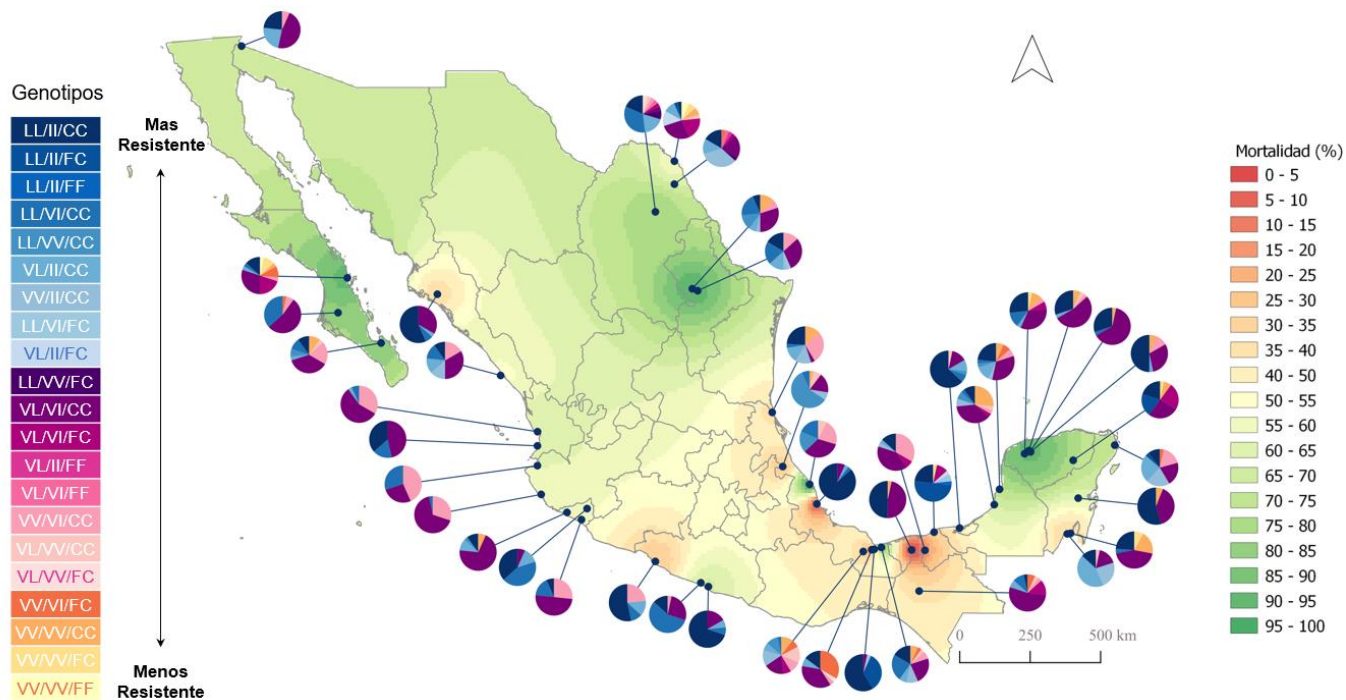


Figura 10. Relación entre genotipos y mortalidad a permetrina

Sin embargo, para la deltametrina (Figura 11) las poblaciones que mostraron mayor resistencia presentaron combinación de genotipo doble heterocigoto para 410 y 1016 +

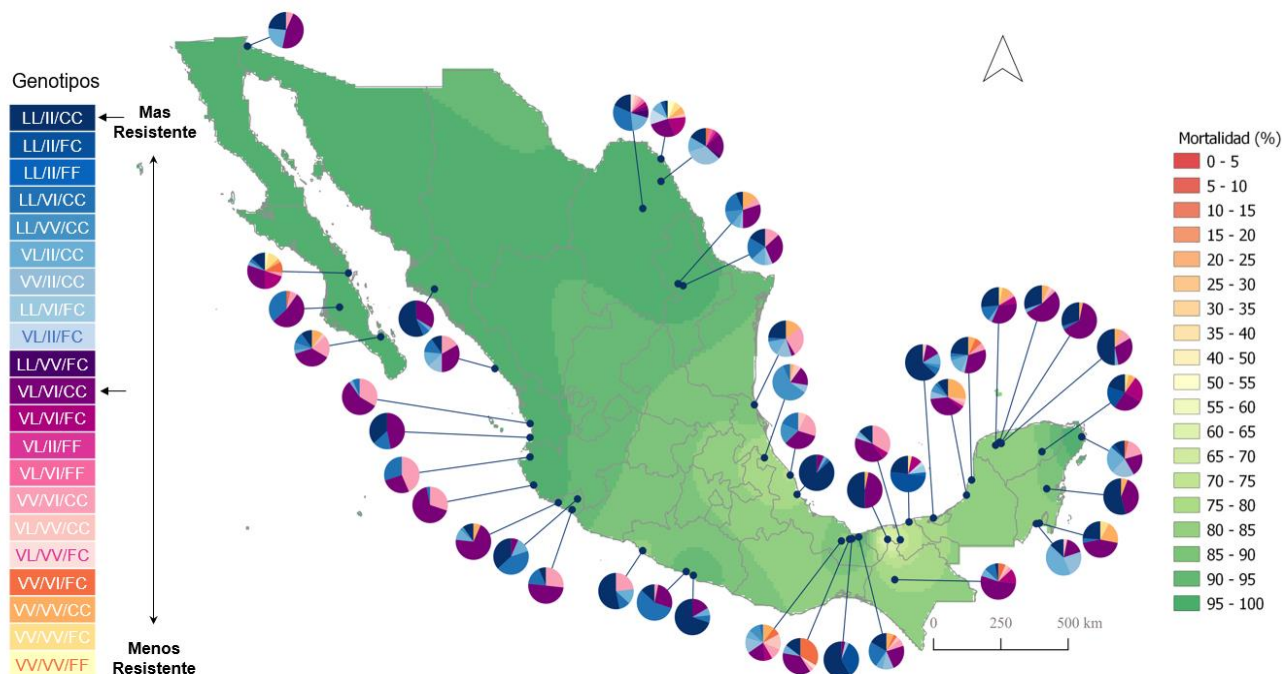


Figura 11. Relación entre genotipos y mortalidad a deltametrina

homocigoto resistente para 1534 (VL/VI/CC) y en otros casos triple homocigoto resistente (LL/II/CC). Por otro lado, no se encontró asociación significativa entre los resultados de los bioensayos con deltametrina y la frecuencia genotípica.

Por otro lado, también encontramos que el incremento en la frecuencia del alelo resistente para 410 se correlaciona significativamente con el incremento en las frecuencias del alelo resistente para 1016 en los individuos que sobrevivieron a la exposición con DD de permetrina con una $P = 0.0002$ (Figura 12).

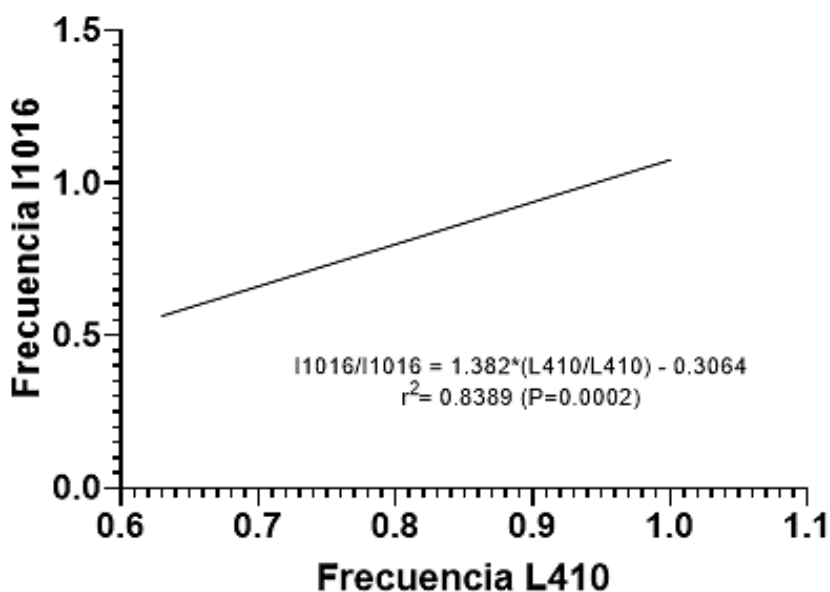


Figura 12. Regresión lineal de la frecuencia alélica de individuos sobrevivientes a DD permetrina

Para el caso de los individuos que sobrevivieron a la deltametrina el incremento en la frecuencia del alelo resistente para 1534 se correlacionó significativamente con el incremento en la frecuencia del alelo resistente para 410 y 1016 con una $P < 0.0001$ en ambos casos, de igual manera se encontró esta relación para los alelos resistentes 410 y 1016 con una $r^2 = 1$ (Figura 13).

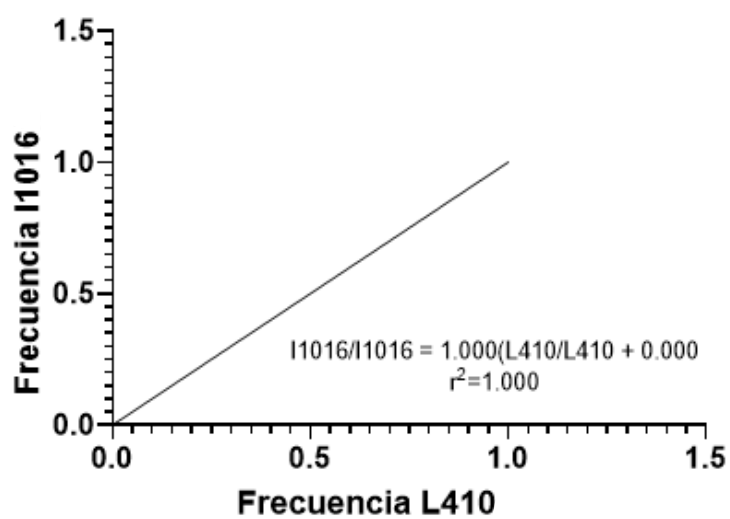
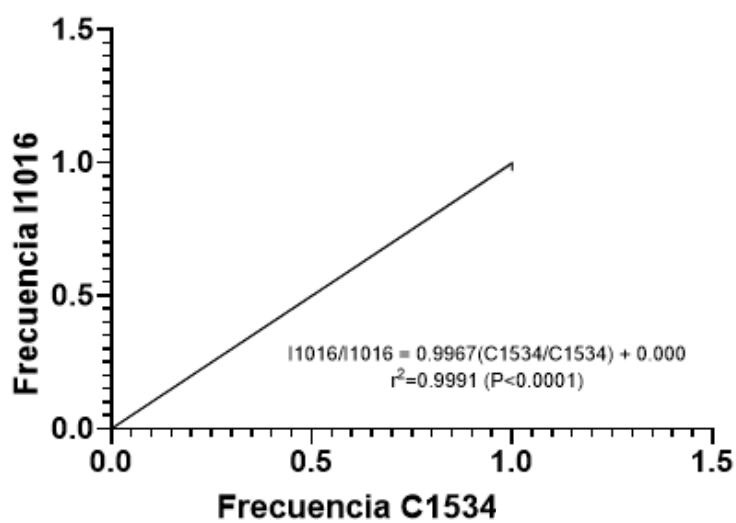
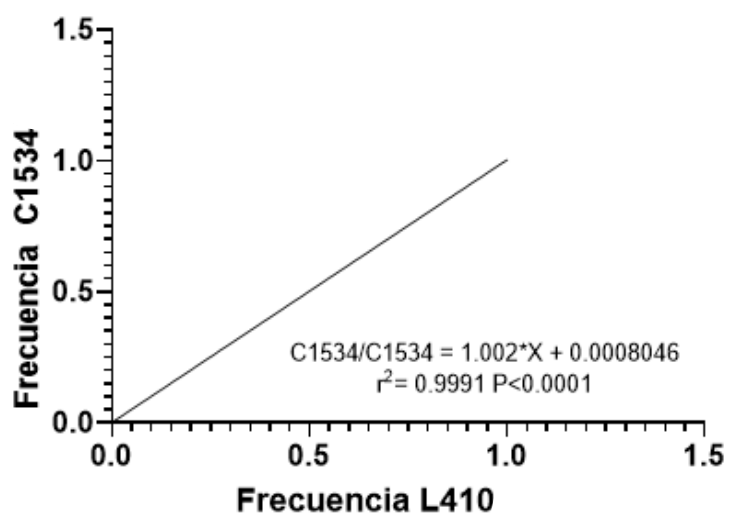


Figura 13. Regresión lineal de la frecuencia alélica de individuos sobrevivientes a DD deltametrina

8. DISCUSIÓN

La mayor frecuencia de resistencia para deltametrina se distribuye en la costa sureste del país específicamente en las poblaciones de Villahermosa (58%), Emilio Carranza (74%) Cosoleacaque (75%), Poza Rica (76%) y Mérida (76%), así también para permetrina en poblaciones de los estados de Veracruz (Cosoleacaque 0% y Cardel 7%) y Tabasco (Villahermosa 3%), un estudio realizado por Verhaeghen et al. (2010) reportó que las variaciones en la genética y la biología de las poblaciones de vectores en ciertos lugares ecológicos podrían influir en la fluctuación espacial en la resistencia a los insecticidas. Esto coincide con los resultados obtenidos en los genotipos de las poblaciones silvestres, ya que las mayores frecuencias de los alelos mutados se pertenecen a poblaciones ubicadas en la en la costa sur del país, específicamente en los estados de Veracruz y Tabasco.

A diferencia del trabajo de Saavedra-Rodríguez et al. (2018) la estrategia metodológica para establecer la susceptibilidad fue diferente, en nuestro trabajo nos apegamos a protocolo del CDC (2010), considerando a los individuos resistentes como aquellos que caían después de la exposición al tiempo diagnóstico (TD) de 30 minutos. En nuestro caso, no consideramos el tiempo de recuperación como en el trabajo referido. Este enfoque que sugieren Saavedra-Rodríguez et al. (2018), permite incluir los genotipos recuperados como resistentes, cuando nosotros los consideramos como muertos. Esto coincide con nuestras observaciones para el caso de la deltametrina, ya que la dosis sugerida por el CDC (2010) de 10 $\mu\text{g}/\text{bt}$, con un tiempo diagnóstico de 30 min resultó altamente letal para la mayoría de los individuos de las poblaciones analizadas, subestimando la resistencia, ya que alta proporción de individuos categorizados como susceptibles presentaron alta frecuencia de alelos resistentes. Por lo anterior consideramos que este factor influyó en la asociación de la resistencia con las mutaciones *kdr* en las poblaciones analizadas. CDC (2020) recientemente actualizó las DD para deltametrina de 0.75 $\mu\text{g}/\text{bt}$ con un TD de 30 min.

En resumen, consideramos que la dosis de deltametrina previno detectar asociación entre las mutaciones *kdr* y la resistencia a este insecticida, por falta de individuos vivos. Algo similar reportó Sombié et al. (2019), quienes no encontraron asociación con la resistencia *kdr* por falta de individuos vivos, aunque en su estudio utilizaron papeletas impregnadas con deltametrina al 0.05% y con una hora de exposición y la evaluación después de 24 post-recuperación.

Para la permetrina, la dosis diagnóstico anteriormente sugerida por el CDC (2010) y que nosotros utilizamos fue de 15 µg/bt con un TD de 30 min, actualmente el CDC (2020) sugiere una dosis de 43 ug/bt con un TD de 10 minutos. Iwani (2019) reporto resistencia en *Ae. aegypti*, cuando se probó una dosis tres veces mayor de permetrina 0.75% en comparación con la dosis discriminatoria recomendada por la OMS (2016) para *Aedes*, 0.25%. Esto sugiere que las dosis diagnósticas discriminatorias recomendadas por la OMS para los mosquitos *Aedes* podrían ser demasiado bajas para los mosquitos *Aedes* en Malasia y deben reevaluarse para los insecticidas piretroides.

Otros autores que han tratado de asociar el efecto aditivo de las mutaciones kdr en la resistencia a piretroides son Plernsub et al. (2016), quienes trabajando con poblaciones de *Ae. aegypti* de Tailandia, encontraron que el genotipo triple heterocigoto SP+VG+FC para las mutaciones S989P, V1016G, F1534C se asoció con alta resistencia a permetrina y deltametrina. A diferencia de nosotros donde el genotipo triple resistente LL+II+CC para 410, 1016 y 1534 se relacionó con los focos de resistencia a permetrina y deltametrina.

En el caso de Al Nazawi et al. (2017) trabajando con poblaciones de *Ae. aegypti* de Arabia Saudita asociaron las mismas mutaciones que Plernsub et al. (2016), sin embargo, ellos encontraron que el PP+GG+FF se asociaba fuertemente con la resistencia a deltametrina, además encontraron que el triple mutante PP+GG+CC se encontraba en individuos susceptibles a deltametrina, punto coincidente con nuestros resultados ya que individuos que murieron a la exposición a deltametrina tuvieron el genotipo triple resistente.

Shimono et al. (2021) analizando las mutaciones S989P-V1016G-T150I-F1534C encontraron que el simple cambio en el genotipo resistente para 1534 asociado con los genotipos resistentes para 989, 1016 y 150 (PP+GG+TT+CC) conferían una mayor resistencia a permetrina (1100 RR) y deltametrina (90 RR) con respecto al genotipo susceptible para 1534 (PP+GG+TT+FF) con 100 y 10 RR respectivamente, coincidiendo con nuestros resultados ya que en nuestro caso los focos de resistencia a permetrina y deltametrina coincidieron con 3 genotipos distintos (LL+II+CC, VL+II+CC y VL+VI+CC), sin embargo, los tres presentaron el homocigoto resistente en el loci 1534. Así también Kushwah et al., (2015). encontraron que la mutación F1534C estaba asociada con la resistencia a la deltametrina en poblaciones de *Ae. aegypti* de India.

Saavedra-Rodríguez et. al. (2019) realizaron un mapeo de las regiones genómicas asociadas con la resistencia a la deltametrina en mosquitos de México, donde reporto que V410L localizado en IIS6 tuvo una fuerte asociación ($-\log_{10}(\text{prob})=17$) con resistencia a deltametrina, esto también se observó en nuestros resultados donde la correlación entre el aumento de la frecuencia de L410 con I1016 y C1534 fue significativo en individuos sobrevivientes a DD de deltametrina. Interesantemente, 1016 y C1534 no fueron asociadas significativamente con la resistencia a deltametrina en el estudio de Saavedra, a diferencia de nuestro estudio donde el aumento de la frecuencia de I1016 y C1534 se correlaciono significativamente en individuos resistentes a deltametrina.

Recientemente Saavedra-Rodríguez et al. (2021) generaron bibliotecas (kdr, recuperados y muertos) utilizando 50 mosquitos *Ae. aegypti* de Tapachula, México, se genotiparon individualmente para V410L utilizando una PCR alelo específica. El 90% de los mosquitos kdr, es decir supervivientes a la hora de exposición a 15µg de permetrina, fueron homocigotos resistentes (L410/L410), mientras que el 10% eran heterocigotos (L410/V410) y el 0% eran homocigotos susceptibles (V410/V410), en nuestro estudio el 65 % de los mosquitos supervivientes a la media hora de exposición a la misma dosis de este insecticida fueron homocigotos resistentes, 28% fueron heterocigotos y 7% homocigotos susceptibles. En el caso de los mosquitos muertos ellos reportaron 0% de homocigotos resistentes, el 36% heterocigotos y el 64% homocigotos susceptibles, mientras que en nuestro caso los mosquitos muertos resultaron con un 43% de homocigotos resistentes, 29% heterocigotos y el 28% homocigotos susceptibles en el total de las 10 poblaciones sometidas a ensayos DD con permetrina. Por su parte, Saavedra-Rodríguez et al. (2021) reportaron que el 8% de los recuperados eran homocigotos resistentes, el 80% eran heterocigotos y el 12% eran homocigotos de tipo salvaje, sin embargo, en este estudio no consideramos tiempo de recuperación como en el trabajo referido.

La frecuencia de C1534 fue alta en todos los individuos tanto en vivos como muertos para ambos insecticidas, esto concuerda con lo reportado previamente por Saavedra et al. (2019) donde en librerías de mosquitos genotificados individualmente, tanto susceptibles como resistentes, la frecuencia de C1534 fue alta (>0.9). Si bien sabemos en México la presión de selección ha favorecido la fijación de C1534 en muchas poblaciones de campo (Vera-Maloof et

al. 2015). Por lo tanto, como lo establece Saavedra et al. (2019), el uso de C1534 como marcador de resistencia a piretroides ya no es informativo en México, sin embargo, C1534 parece ser necesario para la aparición de otras mutaciones (V1016I) y su aumento en la frecuencia en las poblaciones de *Ae. aegypti* de México (Vera-Maloof et al. 2015).

En el caso del polimorfismo en los sitios 1016 y 1534 en *Ae. aegypti* de México en colecciones entre 2000 y 2012, Vera-Maloof et al. (2015) encontraron que la frecuencia de los genotipos resistentes para las mutaciones kdr V1016I y F1534C, aumentaron de casi cero a casi la fijación, en un período de 12 años. Ellos establecieron que el genotipo tipo V1016/C1534 se incrementó primero, pero comenzó a disminuir cuando el doble homocigoto resistente I1016/C1534 comenzó a aumentar. Además, el genotipo I1016/F1534 se observó con bajas frecuencias en algunas poblaciones mexicanas. Los autores deducen que la baja aptitud de I1016/F1534 explica su rareza. También sugirieron que el genotipo V1016/C1534 surgió primero, seguido de I1016/C1534 con una resistencia a piretroides aún mayor. Estos resultados coinciden con los nuestros, ya que las frecuencias del genotipo I1016/F1534 fueron bajas y solo se presentaron en individuos muertos a permetrina, por otra parte, las frecuencias del genotipo I1016/C1534 fueron altas y en mayor proporción que las frecuencias de V1016/C1534, ambos genotipos se presentaron tanto en individuos vivos como muertos a permetrina.

Las frecuencias de las mutaciones V1016I y F1534C obtenidas en las poblaciones de *Ae. aegypti* analizadas fueron altas, como lo reportado previamente en poblaciones de México por Flores et al. (2013), Aponte et al. (2013), López et al. (2014) y Saavedra-Rodríguez et al. (2015). Con respecto a la mutación V410L se cuenta con dos registros de esta mutación en poblaciones de *Ae. aegypti* de México (Saavedra et al. 2018, Villanueva-Segura et al. 2019). El estudio de Villanueva-Segura et al. (2019) demostró que esta mutación estuvo presente en las 27 poblaciones de *Ae. aegypti* colectadas en México durante el 2018, con altas frecuencias, además de que la mayoría de las poblaciones estuvieron en equilibrio de acuerdo con la Ley de Hardy-Weingberg. Las altas frecuencias de la mutación kdr V1016I se ve afectada por la fijación de la mutación F1534C ya que como lo explica Vera-Maloof et al. 2015), éstas aumentan de manera simultánea y como algunos autores mencionan, estas altas frecuencias son seleccionadas debido al uso continuados de piretroides en México por décadas (Siller et al. 2011, Aponte et al. 2013).

En nuestro estudio, al analizar 45 poblaciones silvestres de México, el genotipo con mayor frecuencia fue VL/VI /CC, que concuerda con lo reportado por Saavedra-Rodríguez et al. (2018), indicando que la sola presencia del heterocigoto para 410 y 1016 son suficientes para conferir resistencia al derribo para deltametrina, en contraste, se necesita el alelo mutado para el loci 1534 para conferir resistencia a la permetrina. Sin embargo, al analizar la resistencia a los insecticidas permetrina y deltametrina y la co-ocurrencia de las tres mutaciones, el genotipo con mayor frecuencia fue LL/II/CC seguido de VL /VI /CC.

Por otra parte, los individuos sobrevivientes a permetrina presentaron ocho diferentes genotipos: LL/II/CC VL/II/CC, VL/VI/CC, LL/VI/CC, VV/VV/CC, VL/VV/CC, VV/II/CC y VV/VI/CC; concordando con lo estipulado por Saavedra-Rodríguez et al. (2018), se necesita el alelo mutado para el loci 1534 para conferir resistencia a la permetrina. Sombié et al. (2019), mostraron que altas frecuencias del homocigoto resistente C1534/C1534 confieren resistencia a permetrina, contrario a esto, en nuestro estudio, individuos que no sobrevivieron a la exposición a este insecticida presentaron el genotipo C1534/C1534.

Al comparar la cantidad de genotipos obtenidos por Saavedra-Rodríguez et al. (2018) en poblaciones del sur de México en colecciones de 2000–2016 se evidencia una diferencia, nosotros obtuvimos 17 genotipos diferentes en las poblaciones sometidas a bioensayo con permetrina en comparación con los 7 que reportó Saavedra, sin embargo, en ambos casos el genotipo más común fue el triple homocigoto resistente (LL/II/CC), cabe mencionar que las dosis de exposición varían entre ensayos debido a la naturaleza de estos, a diferencia de este estudio, ellos utilizaron CL_{50} 25 μ g/bt por 60 minutos y un tiempo de recuperación de 4 horas. En los individuos recuperados a esta dosis se encontraron los genotipos LL/II/CC y VL/VI/CC, si bien estos dos genotipos se presentaron en altas frecuencias en los individuos muertos a permetrina en nuestro estudio, sin embargo, no descartamos que individuos que en este ensayo se categorizan como muertos (susceptibles) en realidad sean individuos que tras un tiempo de recuperación se pudieran recuperar y considerarlos como resistentes. No hay que pasar por alto que el diseño de los ensayos dosis diagnóstico no nos permite evaluar la recuperación de los individuos pasado el tiempo de exposición, tomando en cuenta que permetrina tiene un buen efecto knockdown (Maestre-Serrano et al. 2018).

Para el caso de deltametrina en nuestro estudio encontramos el doble de genotipos que Saavedra-Rodríguez et al. (2018), en su caso reportaron 8 genotipos (LL/II/CC, VL/VI/CC, VL/VI/FC, VV/VV/FC, VV/VV/CC, VL/II/CC, LL/VI/CC y VL/VI/FF) de los cuales 7 también fueron encontrados en las poblaciones analizadas por nosotros a excepción del genotipo VL/VI/FF. Por su parte los individuos sobrevivientes a deltametrina solo presentaron el genotipo triple resistente a diferencia de lo reportado por Saavedra-Rodríguez et al. (2018) donde se reportaron tres genotipos (LL/II/CC, VL/VI/CC y VV/VV/CC).

9. CONCLUSIONES

Todas las poblaciones de *Ae. aegypti* resultaron con alta frecuencia de resistencia a la permetrina, con los mayores focos de resistencia en las poblaciones de los estados de Veracruz, Tabasco, Guerrero y Sinaloa.

El 40% de las poblaciones resultaron con alta frecuencia de resistencia a deltametrina, el 28% con moderada y el 32% resultaron susceptibles, con el mayor foco de resistencia en poblaciones del estado de Tabasco.

El genotipo más frecuente fue el VL/VI/CC seguido por el triple resistente LL/II/CC. Los mayores focos de resistencia para el triple resistente LL/II/CC se encontraron en las poblaciones de los estados de Veracruz, Tabasco, Guerrero y Sinaloa. Los mayores focos de resistencia para el doble heterocigoto para 410 y 1016 y resistente para 1534 VL/VI/CC se encontraron en las poblaciones de los estados de Tabasco y Veracruz.

Los focos de mayor resistencia a la permetrina se asociaron de manera significativa con el genotipo triple resistente (LL/II/CC), sin embargo, para deltametrina los genotipos triple resistente (LL/II/CC) y doble heterocigoto para 410 y 1016 y resistente para 1534 (VL/VI/CC) fueron los más frecuentes.

10. PERSPECTIVAS

Lo recomendable para continuar con un monitoreo efectivo que permita realizar un óptimo manejo de la falla de control de la resistencia es seguir realizando ensayos que evalúen estrategias de control vectorial en condiciones de campo y la resistencia genética en términos generales, al menos anualmente y en la mayor cantidad de puntos posibles distribuidos en el país para poder ver la evolución espacio temporal del fenómeno de la resistencia asociada a la respuesta al insecticida que se aplica para el control de los vectores y con esta información realizar predicciones geoespaciales que permitan dilucidar en que áreas del país hay mayor resistencia y realizar un efectivo manejo de la falla del control. Para esto es prescindible la colaboración con las instituciones de control de vectores de cada estado para planear estrategias efectivas con respecto a los resultados obtenidos con las investigaciones que son realizadas por las universidades del país.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agresti, A., y Coull, B. A. 1998. Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician*, Vol. 52(2), 119-126
- Al Nazawi, A.M., Aqili, J., Alzahrani, M., McCall, P. J., & Weetman, D. (2017). Combined target site (kdr) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* from Saudi Arabia. *Parasites Vectors* 10, 161. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2096-6>
- Alvarez LC, Ponce G, Saavedra-Rodriguez K, Lopez B, Flores AE. 2015. Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Manag Sci* Vol. 71: 863-869
- Aponte HA, Penilla PR, Dzul-Manzanilla F, Che-Mendoza A, Lopez A, Solis F, Manrique-Saide P, Ranson H, Lenhart A, McCall PJ, Rodríguez AD., 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pestic Biochem Physiol*, Vol. 107(2): 226–234
- Bariami, V., Jones, C. M., Poupardin, R., Vontas, J., Ranson, H. 2012. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 6(6), e1692.
- Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J., 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology* Vol. 17: 87-94
- Bloomquist JR y Miller TA. 1986. Sodium channel neurotoxin as probes of the knockdown resistance mechanism. *Neurotoxicology* 7 (1): 217-23.
- Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JBP, Valle D y, Martins AJ., 2013. Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on Pyrethroid

- Resistance and Its Fitness Cost. Plos One.;8(4). doi: ARTN e60878 10.1371/journal.pone.0060878. PubMed PMID: WOS:000317898000080.
- Brogdon WG, McAllister JC. 1998. Insecticide resistance and Vector Control. Emerg. Infect. Dis. 4: 605-613.
- Brogdon WG, McAllister JC. 1998b. Simplification of adult mosquito bioassay through use of time mortality determinations in glass bottles. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 14(2): 159-164
- Brogdon W.G., Chan A. 2010. Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a Insecticida en Vectores mediante del ensayo Biológico de la Botella del CDC, Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (Center of Disease Control and Prevention, CDC). Vol. 1, pag.15-20
- Brogdon W. y Chan A. 2010. Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay (with Inserts 1 in 2012 and 2 in 2014). [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/malaria/features/bioassay.html>. [accesed 20 june 2021].
- Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM. 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology Vol. 39: 272-278.
- Chang C, Huang XY, Chang PC, Wu HH, Dai SM. 2012. Inheritance and stability of sodium channel mutations associated with permethrin knockdown resistance in *Aedes aegypti*. Pesticide Biochemistry and Physiology. ;104(2):136-42. doi: 10.1016/j.pestbp.2012.06.003. PubMed PMID: WOS:000311068900010.
- Che-Mendoza Azael, Contreras Perera Yamili, Uc Puc Valentín, Koyoc Cardaña Edgar Dzul Manzanilla Felpie, Manrique Saide Pabo. 2015. Mecanismo de resistencia a los insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* en México. Vector Biology Department, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool L3 5QA, UK, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida C.P. 97000, México., Servicios de Salud del Estado de Guerrero, Chilpancingo C. P. 39090 México. Entomología Mexicana Vol.2:668-674

- Chediak, Mateus, G Pimenta Jr, Fabiano, Coelho, Giovanini E, Braga, Ima A, Lima, José Bento P, Cavalcante, Karina Ribeiro LJ, Sousa, Lindemberg C de, Melo-Santos, Maria Alice V de, Macoris, Maria de Lourdes da G, Araújo, Ana Paula de, Ayres, Constância Flávia J, Andrighetti, Maria Teresa M, Gomes, Ricristhi Gonçalves de A, Campos, Kauara B, & Guedes, Raul Narciso C. 2016. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(5), 311-321.
- Coen, E. S., Strachan, T., Dover, G. (1982) Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* 15, 17–35. [CrossRefGoogle Scholar](#)
- Coleman, M., Hemingway, J., Gleave, K. A., Wiebe, A., Gething, P. W., & Moyes, C. L. 2017. Developing global maps of insecticide resistance risk to improve vector control. *Malaria journal*, 16(1), 86.
- Corbel, V., y N’Guessan, R. (2013). Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: a pragmatic review. In *Anopheles mosquitoes- New insights into malaria vectors*. IntechOpen. DOI: 10.5772/56117
- Darriet, F., y Chandre, F. (2013). Efficacy of six neonicotinoid insecticides alone and in combination with deltamethrin and piperonyl butoxide against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Pest management science*, 69(8), 905-910.
- DOF 2015. NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiologica, promocion, prevencion y control de las enfermedades transmitidas por vectores., DOF. Mexico: Diario Oficial de la Federacion, 1–43
- Dong K., Du Y., Rinkevich F., Nomura Y., Xu P., Wang L., Silver K., Zhorov B. 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid, *Insect biochemistry and molecular biology*. Vol. 50:1-17
- Du Y, Nomura Y, Satar G, Hu Z, Nauen R, He SY, Zhorov BS, Dong K. 2013. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 110:11785-11790

- Du Y, Nomura Y, Zhorov BS, Dong K. 2016. Sodium Channel Mutations and Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti*. *Insects*. Oct 31;7(4):60. doi: 10.3390/insects7040060. PMID: 27809228; PMCID: PMC5198208.
- Dusfour, I., Vontas, J., David, J. P., Weetman, D., Fonseca, D. M., Corbel, V., Raghavendra, K., Coulibaly, M. B., Martins, A. J., Kasai, S., & Chandre, F. 2019. Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(10), e0007615. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007615>
- French-Constant RH. (2013). The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics*. 194(4):807–15. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.141895> PMID: 23908373
- Fernando SD, Hapugoda M, Perera R, Saavedra-Rodriguez K, Black WC 4th, De Silva NK. First report of V1016G and S989P knockdown resistant (kdr) mutations in pyrethroid-resistant Sri Lankan *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasit Vectors*. 2018 Sep 26;11(1):526. doi: 10.1186/s13071-018-3113-0. PMID: 30257701; PMCID: PMC6158842.
- French-Constant RH. The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics*. 2013; 194(4):807–15. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.141895> PMID: 23908373
- Flores AE, Albeldaño VW, Fernández SI, Badii MH, Loaiza BH, Ponce GG, Lozano FS, Brogdon WG, Black IV WC, Beaty B. 2005. Elevated alfa-esterases levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology* Vol. 82(1): 66-78.
- Flores AE, Reyes G, Fernández SI, Sanchez FJ, Ponce GG. 2009. Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in northern Mexico. *Southwestern Entomologist*. Vol.34(2) 167-177.
- Flores AE, Ponce G, Silva B, Gutierrez S, Bobadilla C, Lopez B. Mercado R. Black W. 2013. Widespread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Veracruz state, Mexico. *J Econ Entomol*. Vol. 106: pág. 959–969.

- Francis S, Saavedra-Rodriguez K, Perera R, Paine M, Black WCt, Delgoda R. 2017. Insecticide resistance to permethrin and malathion and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from St. Andrew Jamaica. PLoS One Vol. 12: e0179673
- García, C., García, L., Espinosa-Carreón, L., y Ley, C. 2011. Abundancia y distribución de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y dispersión del dengue en Guasave Sinaloa, México. Revista de biología tropical, Vol. 59(4):1609-1619
- García-Franco F, Muñoz Mde L, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas I, Garcia-Rejon J, Beaty BJ, Black WC 4th. 2002. Large genetic distances among *Aedes aegypti* populations along the South Pacific coast of Mexico. Am J Trop Med Hyg 66:594–598.
- Gil, D. C. Q., Benítez, J. E. O., & Gutiérrez, M. M. 2010. Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. Iatreia, Vol. 23(2):146-156.
- Gorrochotegui-Escalante N, Gomez-Machorro C, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas L, De Lourdes Munoz M, Farfan-Ale JA, Garcia-Rejon J, Beaty BJ, Black WC 4th. (2002) Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. Am J Trop Med Hyg 66:213–222.
- Gorrochotegui-Escalante N, Munoz ML, Fernandez-Salas I, Beaty BJ, Black WC. 2000. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. Am J Trop Med Hyg 62: 200–209
- Granada, Y., Mejía-Jaramillo, A. M., Strode, C., & Triana-Chavez, O. (2018). A Point Mutation V419L in the Sodium Channel Gene from Natural Populations of *Aedes aegypti* Is Involved in Resistance to λ -Cyhalothrin in Colombia. Insects, 9(1), 23. <https://doi.org/10.3390/insects9010023>
- Grossman MK, Uc-Puc V, Rodriguez J, Cutler DJ, Morran LT, Manrique-Saide P. y. Vazquez-Prokopec GM. 2018. Restoration of pyrethroid susceptibility in a highly resistant *Aedes aegypti* population. Biology Letters.;14(6). <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2018.0022>
- Guedes, R. N. C. 2017. Insecticide resistance, control failure likelihood and the First Law of Geography. Pest management science, 73(3):479-484.

- Haddi, K., Tomé, H. V., Du, Y., Valbon, W. R., Nomura, Y., Martins, G. F., Dong K, Oliveira, E. E. 2017. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. Scientific reports, Vol. 7:46549
- Hemingway, J., Vontas, J., Poupardin, R., Raman, J., Lines, J., Schwabe, C., Matias, A. y Kleinschmidt, I. 2013. Country-level operational implementation of the Global Plan for Insecticide Resistance Management. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(23), 9397-9402.
- Hougard, J. M., Corbel, V., N'guessan, R., Darriet, F., Chandre, F., Akogbeto, M., Baldet T., Guillet P., Carnevale P., Traoré-Lamizana, M. 2003. Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. Bulletin of entomological research, 93(6):491-498.
- Icaza, J. T. 2003. El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. México: Bayer [Bayer Environmental Science] pag.17-26
- Imam, H., Sofi, G., Zarnigar and Aziz, S. 2014. The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). Tropical Parasitology, Vol. 4(1):53
- Iwani J (2019). Investigating insecticide resistance mechanisms in dengue vectors population; *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Penang Island. Master of Science Thesis, Universiti Sains Malaysia.
- Kushwah RB, Dykes CL, Kapoor N, Adak T, Singh O.P. 2015 Pyrethroid-resistance and presence of two knockdown resistance (kdr) mutations, F1534C and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis.; 9(1):e3332.
- Kushwah, R. B. S., Kaur, T., Dykes, C. L., Kumar, R. H., Kapoor, N., & Singh, O. P. 2019. A new knockdown resistance (kdr) mutation F1534L in *Aedes aegypti* associated with insecticide resistance. *bioRxiv*, 740829. <https://doi.org/10.1101/740829>

- Linss JG, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Lima JB, Valle D, Martins AJ. 2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasit Vectors*. Vol. 7:25
- Lopez-Monroy, B., Gutierrez-Rodriguez, S. M., Villanueva-Segura, O. K., Ponce-Garcia, G., Morales-Forcada, F., Alvarez, L. C., y Flores, A. E. 2018. Frequency and intensity of pyrethroid resistance through the CDC bottle bioassay and their association with the frequency of kdr mutations in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. *Pest management science*. Vol. 74(9):2176-2184.
- Loughney, K., Kreber, R., & Ganetzky, B. 1989. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell*, Vol. 58(6):1143-1154
- Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas I, de Lourdes Munoz M, Garcia-Rejon J, Olson KE, Beaty BJ, Black WC 4th. 2009. The Neovolcanic Axis Is a Barrier to Gene Flow among *Aedes aegypti* Populations in Mexico That Differ in Vector Competence for Dengue 2 Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 3(6): e468. doi:10.1371/journal.pntd.0000468
- Lozano-Fuentes, S., Hayden, M. H., Welsh-Rodriguez, C., Ochoa-Martinez, C., Tapia-Santos, B., Kobylinski, K. C., Uejio C.K., Zielinski-Gutierrez E., Monache L. D., Monaghan A. J., Steinhoff, D. F. y Eisen L., 2012. The dengue virus mosquito vector *Aedes aegypti* at high elevation in Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 87(5):902-909.
- Maestre-Serrano R, Gomez-Camargo D, Ponce-Garcia G, Flores AE. 2014. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. *Pestic Biochem Physiol* Vol.116:63-73.
- Maestre-Serrano R., Fontecha-Pacheco B., Guerrero-Villanueva J., Acosta., Guerra, M., & Pareja-Loaiza, (2018). Resistencia knockdown a DDT y piretroides en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*: especies de interés en salud pública. *Miembros Activos Invawet*, 307.

- McAllister, J. C., Scott, M., & Centers for Disease Control and Prevention. (2020). CONUS Manual for Evaluating Insecticide Resistance in Mosquitoes Using the CDC Bottle Bioassay Kit. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pag. 7.
- Moyes, C. L., Wiebe, A., Gleave, K., Trett, A., Hancock, P. A., Padonou, G. G., Chouaïbou, M. S., Sovi, A., Abuelmaali, S. A., Ochomo, E., Antonio-Nkondjio, C., Dengela, D., Kawada, H., Dabire, R. K., Donnelly M. J., Mbogo, C., Fornadel, C. & Antonio-Nkondjio, C. 2019. Analysis-ready datasets for insecticide resistance phenotype and genotype frequency in African malaria vectors. *Scientific data*, 6(1):1-11.
- Muñoz L., M., Mercado-Curiel, R. F., Diaz-Badillo, A., Ramirez, G. P., & Black, W. C. 2013. Gene flow pattern among *Aedes aegypti* populations in Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 29(1):1-19.
- Nauen Ralf. 2007. Perspective Insecticide resistance in disease vectors of public health importance, Bayer CropScience AG, Research, Biology Insecticides, Alfred Nobel Str. 50, D-40789
- Nelson MJ. 1986. *Aedes aegypti*: Biology and Ecology. Pan-American Health Organization. Washington, D.C. PNSP. pág 86-64
- Nkya, T., Akhouayri, I., Kisinza, W. and David, J. 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(4):407-416
- Nkya, T. E., Poupardin, R., Laporte, F., Akhouayri, I., Mosha, F., Magesa, S., Kisinza W., David, J. P. 2014. Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a multigenerational study in controlled conditions. *Parasites & vectors*, 7(1):480.
- OMS (2016). Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations: Interim guidance for entomologists. WHO/ZIKV/VC/16.1.
- Pearson, K. 1903. Mathematical Contributions to the Theory of Evolution. XI. On the Influence of Natural Selection on the Variability and Correlation of Organs. *Philosophical*

- Transactions of the Royal Society of London, 200(Ser. A), 1–66.
<https://doi.org/10.1098/rsta.1903.0001>
- Plernsub, S., Saingamsook, J., Yanola, J., Lumjuan, N., Tippawangkosol, P., Sukontason, K., Walton C. & Somboon, P. (2016). Additive effect of knockdown resistance mutations, S989P, V1016G and F1534C, in a heterozygous genotype conferring pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Parasites Vectors* 9, 417.
<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1713-0>
- Ponce G, Flores A, Fernandez I, Saavedra K, Reyes G, Lozano S et al. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knockdown resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* Vol. 3(10): e531.
- Ponce-Garcia G, Del Rio-Galvan S, Barrera R, Saavedra-Rodriguez K, Villanueva-Segura K, Felix G, Amador M, Flores AE. 2016. Knockdown Resistance Mutations in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Puerto Rico. *J Med Entomol* Vol. 53:1410-1414.
- Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N, Chevillon C. 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica*. 112:287–96. PMID:11838771
- Rinkevich FD, Du Y, Dong K. 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol*. Vol. 106:93–100
- Ryan, S. J., Mundis, S. J., Aguirre, A., Lippi, C. A., Beltrán, E., Heras, F., Sanchez, V., Borbor-Cordova, M. J., Sippy, R., Stewart-Ibarra, A. M. & Neira, M. 2019. Seasonal and geographic variation in insecticide resistance in *Aedes aegypti* in southern Ecuador. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(6), e0007448.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black WC. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* Vol. 16:785-798.

- Saavedra-Rodriguez K, Beaty M, Lozano-Fuentes S, Denham S, Garcia-Rejon J, Reyes-Solis G, Machain-Williams C, Loroño-Pino MA, Flores AE, Ponce G, Beaty B, Eisen L, Black IV WC. 2015. Local Evolution of Pyrethroid Resistance Offsets Gene Flow among *Aedes aegypti* Collections in Yucatan State, Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 92(1):201-209.
- Saavedra-Rodriguez Karla, Vera-Maloof, Farah, Campbell Corey, Garcia-Rejon Julian, Lenhart Audrey, Penilla Patricia, Rodriguez Americo, Acero Arturo, Flores Adriana, Ponce Gustavo, Lozano Saul and Black IV William C. 2018. Parallel evolution of *vgsc* mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Scientific Reports* vol. 8, Artículo número: 6747
- Saavedra-Rodriguez K, Campbell CL, Lenhart A, Penilla P, Lozano-Fuentes S, Black WC 4th. 2019. Exome-wide association of deltamethrin resistance in *Aedes aegypti* from Mexico. *Insect Mol Biol.* Oct;28(5):591-604. doi: 10.1111/imb.12575. Epub 2019 Mar 13. Erratum in: *Insect Mol Biol.* 2020 Oct;29(5):498. PMID: 30758862; PMCID: PMC6766855.
- Saavedra-Rodriguez K, Campbell CL, Lozano S, Penilla-Navarro P, Lopez-Solis A, SolisSantoyo F, et al. (2021) Permethrin resistance in *Aedes aegypti*: Genomic variants that confer knockdown resistance, recovery, and death. *PLoS Genet* 17(6): e1009606. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009606>
- Scott, J. G. 2019. Life and Death at the Voltage-Sensitive Sodium Channel: Evolution in Response to Insecticide Use. *Annual review of entomology*, Vol. 64:243-257
- Scott, M. L., Hribar, L. J., Leal, A. L., & McAllister, J. C. (2021). Characterization of Pyrethroid Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* from the Florida Keys, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(3), 1111-1122.
- Shimono, T., Kanda, S., Lamaningao, P. Murakami, Y., Darcy, A. W., Mishima, N., Inthavongsack, S., Soprasert, O., Xaypangna T. & Nishiyama, T. (2021). Phenotypic and haplotypic profiles of insecticide resistance in populations of *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae) from central Lao PDR. *Trop Med Health* 49, 32 (2021). <https://doi.org/10.1186/s41182-021-00321-3>

- Siller Q., Ponce G., Lozano S. and Flores A. 2011. Update on the Frequency of Ile1016 Mutation In Voltage-Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* In Mexico. Journal of the American Mosquito Control Association Vol. 27(4):357-362. DOI: <http://dx.doi.org/10.2987/11-6149.1>
- Smith, L., Kasai, S. and Scott, J. 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. Pesticide Biochemistry and Physiology, Vol. 133:1-12
- Soderlund D. 2005. Sodium Channels. Comprehensive Insect Science. Pharmacology. Amsterdam Elsevier B.V. vol 5:124
- Sombié A, Saiki E, Yaméogo F, Sakurai T, Shirozu T, Fukumoto S, Sanon A, Weetman D, McCall PJ, Kanuka H, Badolo A. 2019. High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgandé (Ouagadougou), Burkina Faso. Trop Med Health. Jan 4;47:2. doi: 10.1186/s41182-018-0134-5. PMID: 30787670; PMCID: PMC6318976.
- Souris, M, Marcombe, S., Laforet, J., Brey, P.T., Corbel V., Overgaard H.J. 2017. Modeling spatial variation in risk of presence and insecticide resistance for malaria vectors in Laos. PLoS ONE 12(5):e0177274.
- Srisawat R, Komalamisra N, Eshita Y, Zheng MQ, Ono K, Itoh TQ, Matsumoto A, Petmitr S, Rongsriyam Y. 2010. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Applied Entomology and Zoology Vol. 45:275-282
- Urdaneta-Marquez L, Bosio C, Herrera F, Rubio-Palis Y, Salasek M, Black WC. 2008. Genetic Relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as determined by mitochondrial ADN variation and nuclear single nucleotide polymorphisms. Am J Trop Med Hyg. 78(3):479-91.
- Vera-Maloof, F. Z., Saavedra-Rodriguez, K., Elizondo-Quiroga, A. E., Lozano-Fuentes, S., & Black IV, W. C. (2015). Coevolution of the Ile1, 016 and Cys1, 534 mutations in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. PLoS neglected tropical diseases, 9(12), e0004263.

- Vera-Maloof, F., Saavedra-Rodriguez, K., Penilla-Navarro, R. P., Rodriguez-Ramirez, A. D., Dzul, F., Manrique, P., & Black, W. C. (2019). Loss of pyrethroid resistance in newly established laboratory colonies of *Aedes aegypti*. bioRxiv, 760710.
- Verhaeghen K, Bortel WV, Roelants P, Okello PE, Talisuna A, Coosemans M, 2010. Spatio-temporal patterns in kdr frequency in permethrin and DDT resistant *Anopheles gambiae* s.s. from Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 82: 566–573.
- Villanueva-Segura, O. K., Ontiveros-Zapata, K. A., Lopez-Monroy, B., Ponce-Garcia, G., Gutierrez-Rodriguez, S. M., Davila-Barboza, J. A., Mora-Jasso, E. J. and Flores, A. E. (2020). Distribution and Frequency of the kdr Mutation V410L in Natural Populations of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) From Eastern and Southern Mexico. *Journal of Medical Entomology*, Xx(X), pág. 1–6. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz148>
- Watson, D. y Phillip, G. (1985): A Refinement of Inverse Distance Weighted Interpolation. *GeoProcessing*, Elsevier Science Publishers, N° 2, pp. 315-327.
- Williamson M, Martinez-Torres D, Hick C and Devonshire A. 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet*. Vol. 252: 51–60.
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara LA. 2011. Highthroughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical Medicine and International Health* Vol. 16:501-509.